

**Zur Identifizierung von
Enterotoxin-bildenden E.coli-Stämmen
aus Milch und Milchprodukten**

Volker Franke

1983

Aus dem Institut für Hygiene
der Bundesanstalt für Milchwissenschaft in Kiel
Ltd. Direktor: Prof. Dr. A. Tolle

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. Anton Mayr

Zur Identifizierung von Enterotoxin-bildenden E.coli-Stämmen
aus Milch und Milchprodukten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Volker Franke
aus
Grossensee

Gedruckt mit Genehmigung der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan
Referent: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 25. Februar 1983



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND VORBEREITUNGEN

1.1. THEMA

1.2. KURZFASSUNG, ZIELSETZUNG UND DURCHFÜHRUNG DES VORLESUNGSPROJEKTES

1.3. VERGLEICHUNG MIT ANDEREN VERFAHRENEN

1.3.1. Vergleichende Analyse

1.3.2. Vergleichende Analyse

1.3.3. Vergleichende Analyse

1.3.4. Vergleichende Analyse

1.3.5. Vergleichende Analyse

1.3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion

2. THEMA: ALLE MEINEN ELTERN

2.1. THEMA UND THEMA

2.2. THEMA

3. THEMA IN DER THEMA

4. THEMA IN DER THEMA

4.1. THEMA

4.1.1. THEMA

4.1.2. THEMA

4.1.3. THEMA

4.1.4. THEMA

4.1.5. Zusammenfassung und Diskussion

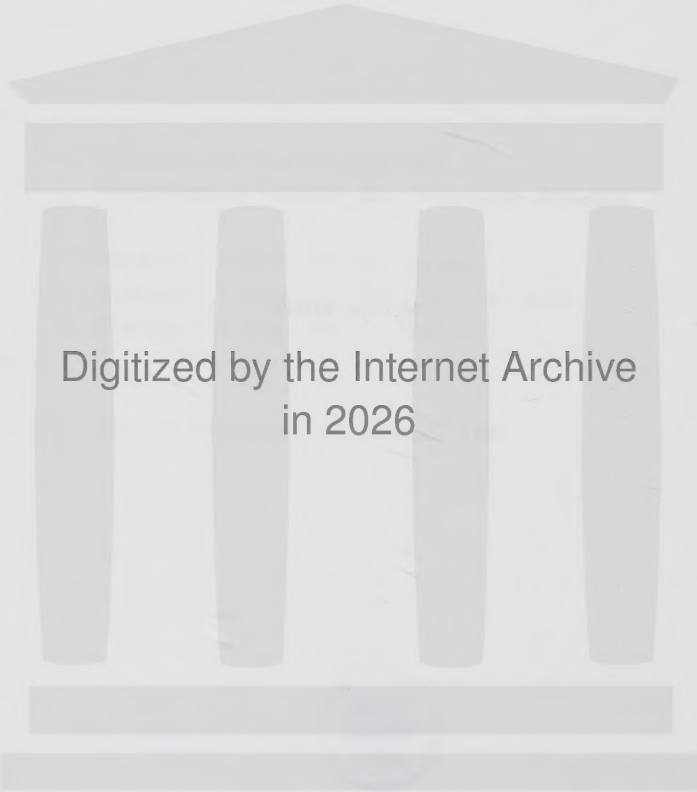
4.2. THEMA

4.2.1. Zusammenfassung, Diskussion und abschließende Bemerkungen

4.2.2. Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen

4.2.3. Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen

4.2.4. Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. SCHRIFTTUM	3
2.1 Kulturelle, biochemische und serologische Eigenschaften der species E.coli	3
2.2 Prinzipien der Pathogenität	4
2.2.1 Enteropathogene E.coli	4
2.2.2 Enteroinvasive E.coli	5
2.2.3 Enterotoxin-bildende E.coli	5
2.2.3.1 Thermolabiles Toxin	6
2.2.3.2 Thermostabiles Toxin	9
2.2.3.3 Beziehungen zwischen Serotyp und Enterotoxinbildung	11
2.3 E.coli als "Lebensmittelvergifter"	12
2.3.1 Vorkommen und Verbreitung	13
2.3.2 Symptomatik	15
2.4 E.coli in Milchprodukten	16
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	20
3.1 Material	20
3.1.1 Referenzstämme	20
3.1.2 Feldstämme	21
3.1.3 Lebensmittel	21
3.1.4 Versuchstiere	21
3.1.5 Anzüchtungs- und Isolierungsmedien	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Kulturelle, biochemische und serologische Differenzierung	22
3.2.2 Identifizierung von L-Toxin-Bildnern	22
3.2.3 Identifizierung von S-Toxin-Bildnern	29
3.2.4 Isolierung und Quantifizierung von E.coli aus Untersuchungsmaterial	31

	Seite
3.2.5 Untersuchung auf L-Toxin- bzw. S-Toxin-Bildung in vitro	32
3.2.5.1 Anreicherung und Toxinnachweis aus Lebensmitteln	32
3.2.5.2 Experimentelle Inokulation und Bebrütung verschiede- ner Nährsubstrate	33
4. ERGEBNISSE	34
4.1 Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von E T E C L - und S - T o x i n	34
4.1.1 Beziehungen zwischen kulturellen/biochemischen Eigen- schaften und dem Toxinbildungsvermögen von E.coli	34
4.1.2 Serologische Identifizierung von L-Toxin-bildenden E.coli	35
4.1.2.1 MANCINI- und ELEK-Test	35
4.1.2.2 Staphylokokken-Coagglutination	36
4.1.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA	39
4.1.3 Nachweis von S-Toxin-bildenden E.coli mit dem Baby-Maus-Test	44
4.2 Prüfung von ELISA und BMT an aus Lebensmitteln isolier- ten Feldstämmen	48
4.3 Vorschlag für einen Untersu- chungsgang zum Nachweis von E T E C	49
4.4 Zur Frage der Präformation von E T E C L - und S - T o x i n e n in Lebensmitteln	52
5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	54
6. ZUSAMMENFASSUNG	60
7. LITERATURVERZEICHNIS	63
8. ANHANG	71

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die ätiologische Bedeutung von *E.coli* bei der Diarrhoe von Jungtieren ist seit langem unbestritten. In jüngster Zeit konnte die immunogene Wirkung der am Dünndarmepithel das pathogenetische Geschehen einleitenden Haftfaktoren (Pili) nachgewiesen und durch genetische Manipulation die Anlage zur Bildung dieser Pili von Feldstämmen auf Laborstämme übertragen werden. Dieses ermöglicht die rationelle Herstellung einer wirksamen Vakzine und ist damit eine der ersten Nutzungen der zukunftssträchtigen Gen-Technologie.

Auch bei Gastroenteritiden des Menschen werden neben den klassischen Erregern häufig als pathogen angesehene *E.coli*-Stämme isoliert. Das Spektrum des klinischen Erscheinungsbildes der durch sie hervorgerufenen Darmkrankheiten reicht von Diarrhoen beim Säugling und Kleinkind bis zu schweren Cholera- oder Shigellose-ähnlichen Symptomen beim Erwachsenen.

Nach heutiger Auffassung können Gastroenteritiden-auslösende *E.coli* entsprechend ihren unterschiedlichen pathogenetischen Prinzipien in drei Gruppen eingeteilt werden:

a. Enteropathogene *E.coli* (EPEC).

EPEC sind die für Säuglinge pathogenen Stämme bzw. Serotypen, die bisher als Dyspepsie *E.coli* bezeichnet wurden (der allgemeine Terminus enteropathogen zeigt an, daß das Wirkungsprinzip noch nicht definitiv geklärt ist)

b. Enteroinvasive *E.coli* (EIEC).

EIEC zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, in das Darmepithel einzudringen und verursachen Entzündungserscheinungen, die denen der Shigellaruhr gleichen.

c. Enterotoxin-bildende *E.coli* (ETEC).

ETEC bilden Toxine, die nach ihrer Hitzeempfindlichkeit in hitzestabile (ST) oder hitzelabile (LT) Toxine untergliedert werden.

In Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen sind Vertreter aller drei Gruppen aus Patientenstuhl isoliert worden. Daraus leitet sich die Notwendigkeit ab, sie auch aus Lebensmitteln tierischer Herkunft sicher zu identifizieren, da diese nicht selten mit *E.coli* kontaminiert sind. Mit herkömmlichen bakteriologischen Methoden ist eine Differenzierung pathogener und apathogener *E.coli* nicht möglich.

Für die vorliegende Dissertation wurde mir von Prof. Dr. A. Tolle die Aufgabe gestellt

1. in der neueren Literatur beschriebene, für spezifische Forschungszwecke entwickelte Methoden zum Nachweis von E.coli L- und S-Toxinen auf ihre Eignung zur lebensmittelhygienischen Diagnostik vergleichend zu prüfen,
2. die ausgewählten Methoden in Untersuchungen an Handelsproben von Milch und Milchprodukten auf ihre Aussagekraft und Praktikabilität zu untersuchen
und aufgrund der gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen
3. einen Untersuchungsgang zum Nachweis von E.coli-Enterotoxinen aus Milch und Milchprodukten abzuleiten.

Zudem sollte die Frage bearbeitet werden, ob E.coli-Enterotoxine bereits im Lebensmittel präformiert werden und damit unmittelbar zur Intoxikation führen können oder erst eine Manifestation der Erreger im Intestinum Voraussetzung für deren Toxinbildung im Wirtsorganismus ist.

2. SCHRIFTTUM

- 2.1 Kulturelle, biochemische und serologische Eigenschaften der species *E. coli* (nach BERGEY, 1974; ROLLE/MAYR, 1978; HALLMANN/BURKHARDT, 1974)

Taxonomie:

Familie: Enterobacteriaceae

Gattung: *Escherichia*

einzigste species: *E. coli*

Morphologie: Mittelgröße (1,0 - 1,5 µm breit, 2,0 - 6,0 µm lang), gramnegative Stäbchen; überwiegend begeißelt; nur vereinzelt Kapselbildung oder Fimbrien.

Kultur: Nitrative Ansprüche gering; kuppiges Wachstum auf allen üblichen Substraten; Koloniedurchmesser nach 24 h Bebrütung 1 - 3 mm; Kolonieform: mäßig gewölbt bis flach, rundlich oder unregelmäßig, glatt (S-Form) oder rau (R-Form). Ein Teil der Stämme hämolysierend, gelegentlich Schleimbildung, etwa 1/3 der Stämme nicht beweglich.

Biochemie: In der 'Bauten Reihe' werden zu >90% folgende Substrate gespalten: Laktose, Maltose, Arabinose, Trehalose, Mannit und Glycerin.

Nicht gespalten werden: Inositol, Harnstoff, Malonat, Gelatine und Citrat.

In der Regel positiv sind: Indol- und Methylrotprobe.

Nicht gebildet werden: H_2S und Phenylalanin-Desaminase.

Negative Resultate liefern: KCN- und Voges-Proskauer-Test.

Serologie: Es werden O-, H- und K-Antigene unterschieden. Zusätzlich können M-(mucus = Schleim)- und F-(Fimbrien)-Antigene vorkommen.

1. Somatische (O-Antigene)

Chemisch handelt es sich um einen Lipopolysaccharid-Protein-Komplex, der in der Zellwand lokalisiert ist. Die O-Antigene sind mit dem Endotoxin identisch und bewirken nach parenteraler Applikation relativ hohe Antikörpertiter. Die Agglutinabilität wird erst nach einer 2-stündigen Erhitzung auf 100° - 120°C aufgehoben. Es sind etwa 150 mit arabischen Zahlen bezeichnete Coli-O-Gruppen bekannt.

2. Hüllen-(K-)Antigene

sind aus Polysacchariden aufgebaut und an der Zelloberfläche lokalisiert. Nach KAUFFMANN kann man sie aufgrund der unterschiedlichen

Hitzeempfindlichkeit in drei Gruppen - L, B und A - unterteilen. Die K-Antigene verhindern die O-Agglutinabilität. Daher wird bei der Serotypisierung von E.coli-Stämmen erst mit homologen L, B oder A-Seren das K-Antigen bestimmt. Um eine Agglutination mit O-Seren zu ermöglichen, wird die Keimsuspension mindestens eine Stunde erhitzt.

Normalerweise besitzen Colistämme nur eines der drei möglichen K-Antigene. Unabhängig vom Typ des Antigens wird heute mit fortlaufenden arabischen Zahlen numeriert; die Art des Antigens kann in Klammern angefügt sein, z.B. K 25 (B).

3. Geißel-(H-)Antigene:

werden nach 1 Stunde bei 100°C zerstört. Als Proteine haben sie gute antigene Eigenschaften.

2.2 Prinzipien der Pathogenität

Die in der Einleitung beschriebene Kategorisierung pathogener E.coli in EPEC, EIEC und ETEC ist in Auswertung aller vorhandenen Kenntnisse von ØRSKOV u. ØRSKOV (1978) vorgeschlagen worden und wird allgemein akzeptiert.

2.2.1 Enteropathogene E.coli (EPEC)

Seit Jahrzehnten werden bestimmte, serologisch erfaßbare Stämme von E.coli als Ursache für Säuglingsdiarrhoen angesehen. Sie werden gemeinhin als Dyspepsie-E.coli bezeichnet. Für die Diagnostik dieser Serotypen stehen kommerziell erhältliche Seren zur Verfügung.

In Deutschland sind dieses:

O 26 K 60, O 55 K 59, O 78 K 80, O 86 K 61, O 111 K 58, O 114 K -, O 119 K 69, O 124 K 72, O 125 K 70, O 126 K 71, O 127 K 63, O 128 K 67.

Die Pathogenese der durch EPEC hervorgerufenen Durchfälle ist noch nicht geklärt (9). So konnte weder eine Toxinbildung noch eine Invasionsfähigkeit dieser Stämme nachgewiesen werden. Eine Reihe von Autoren (34,41,92) verneint daher die ätiologische Bedeutung dieser Keime. Jedoch liegen epidemiologische Beobachtungen vor, die überzeugende Hinweise auf eine ursächliche Beteiligung von EPEC liefern (44). Durch Infektionsversuche konnte inzwischen belegt werden, daß bestimmte Serotypen für Säuglingsdiarrhoen verantwortlich zu machen sind (69). Als wirksames Prinzip werden entero-

toxische Substanzen vermutet (64,82), deren Struktur bisher unbekannt und deren pathogenetische Bedeutung noch nicht geklärt ist, da eine Nachweismöglichkeit z.Z. noch nicht zur Verfügung steht.

2.2.2 Enteroinvasive E.coli (EIEC)

Diese Stämme rufen ein ruhrähnliches Krankheitsbild hervor, indem sie in die Schleimhäute von Dün- und Dickdarm eindringen. Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch Fieber, Darmkrämpfe und wässrigen Durchfall, in schweren Fällen gefolgt von Tenesmus sowie Schleim- und Blutauflagerungen des Stuhls (112,7). Diese invasiven E.coli-Stämme gehören einer begrenzten Anzahl von O-Gruppen (O 25, O 28, O 112, O 115, O 124, O 136, O 143, O 144, O 147, O 152) an. Zum Teil besitzen sie mit Shigella-Serotypen identische oder stark kreuzreagierende somatische Antigene. Normalerweise können sie durch ihre Fähigkeit, Lysine zu dekarboxylieren, Mukat zu fermentieren und durch Nutzung von Acetat identifiziert werden. Die Invasionsfähigkeit wird mit dem Sereny-Test geprüft (67,99). Ein Nachweisprinzip besteht darin, daß EIEC-Stämme in die Epithelialzellen der Cornea des Meerschweinchens einzudringen vermögen und dadurch eine Keratokonjunktivitis verursachen. Eine weitere Möglichkeit, die Invasivität fraglicher Stämme zu bestimmen, besteht im Nachweis eines zytotoxischen Effekts an HeLa-Zellen (33,23). Nach HARRIS et al. (1982) ist die Invasionsfähigkeit von EIEC-Stämmen Plasmid-codiert.

2.2.3 Enterotoxin-bildende E.coli (ETEC)

Die Enterotoxinbildung bestimmter E.coli-Stämme ist seit Mitte der 60er Jahre bekannt. Seitdem wird die Frage gestellt, ob enterotoxische E.coli-Stämme anhand phänotypischer Merkmale zu identifizieren sind. Bei dem naheliegenden Vergleich zwischen Enterotoxinbildung und Hämolyseaktivität (102) zeigte sich, daß 34% - 70% der ETEC ein Plasmid-determiniertes Hämolyysin (Hly) bilden (61). Allerdings kommt dieses Hly-Plasmid auch bei Toxin-negativen Stämmen vor.

Nach EVANS und EVANS (1973) haben 66,6% der ETEC-Stämme, die von Patienten mit Cholera-ähnlichen Diarrhoen isoliert wurden, drei Eigenschaften gemeinsam: Keine Verwertung von Saccharose, geringes Wachstum in einem Peptonmedium bei pH 8,5 und Produktion eines mit Ammoniumsulfat präzipitierbaren Materials. Die Toxin-negativen Kontrollstämmen wiesen diese

drei Merkmale nur zu 9,3% auf. HOBBS et al. (1976) überprüften diese Aussage anhand von 185 Stämmen und kamen zu dem Ergebnis, daß die drei Kriterien keinen Hinweis auf eine Toxinbildung geben.

DE BOY II et al. (1980) zeigten, daß die Verwertung von Saccharose nicht mit der Enterotoxinproduktion korreliert, sondern vom Serotyp abhängig ist. 24% der von ihnen geprüften ETEC waren Adonit-positiv und Dulcit-negativ, während nur 2% der Nicht-ETEC diese Eigenschaften aufwiesen. Bei Adonit-positiven und Dulcit-negativen Stämmen besteht somit eine relativ enge Beziehung zur Enterotoxin-Bildung.

ETEC sind in der Lage, zwei verschiedene Toxine zu produzieren, ein thermolabiles (LT) und ein thermostabiles (ST) Toxin (27). Ein bestimmter Stamm bildet meist nur eines dieser Toxine, nicht selten aber auch beide gleichzeitig. Die Fähigkeit, Toxine zu bilden, ist bei E.coli auf einem übertragbaren Plasmid codiert (102). Somit ist die Möglichkeit gegeben, daß negative Stämme zu Toxinbildnern werden können bzw. positive Stämme diese Fähigkeit verlieren (30).

2.2.3.1 Thermolabiles Toxin

Struktur und Wirkung

Das thermolabile E.coli-Enterotoxin ist dem Cholera-toxin sehr ähnlich (s.Tab.1). Aus der Vielzahl der Forschungsarbeiten zur Klärung der pathogenetischen Bedeutung des Cholera-toxins haben sich dadurch für das E.coli L-Toxin eine Reihe grundlegender Erkenntnisse übertragen lassen.

Tab. 1: Gegenüberstellung von Cholera-toxin und thermolabilem E.coli-Enterotoxin

Eigenschaft	Cholera-toxin	E.coli LT
Genetische Lokalisation	Chromosom	Plasmid
Molekulargewicht	84.000	73.000
Struktur und Größe der Untereinheiten	A-Kette: $A_1 + A_2$ $A_1 = 24.000$, $A_2 = 9.700$ B-Kette, bestehend aus 4 - 6 Untereinheiten pro Molekül (9.700)	A-Kette: 25.500 - 30.000 B-Kette = 44.000, bestehend aus 4 - 6 Untereinheiten (11.000 - 11.500)
Rezeptor	Gangliosid (GM_1)	Gangliosid (GM_1)
Stimulierung der Adenylzyklase	+	+

(aufgrund von Literaturangaben nach Bockemühl, 1980)

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, hat das aus einer A- und B-Kette aufgebaute E.coli L-Toxin ein Molekulargewicht von ca. 73.000 (15). Mit seiner Aufnahme beginnt ein Ereignisablauf, der beim Cholera-toxin weitgehend geklärt und aller Wahrscheinlichkeit nach auch für das L-Toxin zutreffend ist (38). Die B-Kette (Molekulargewicht von ca. 44.000) bewirkt die Bindung des Toxins an den Rezeptor der Darmepithelzelle (37), ein Monosialogangliosid (GM_1). Die A-Kette (Molekulargewicht von 25.000 - 30.000) ist für die Stimulierung der Adenylzyklase verantwortlich, und zwar auf folgendem Weg: Sie stimuliert zunächst den Transfer der Adenin-di-phosphat-Ribose von NAD (Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid) auf ein GTP (Guanosin-Triphosphat)-bindendes Protein. Danach wird zusammen mit der Adenylzyklase aus ATP (Adenosin-Triphosphat) zyklisches AMP (3',5' Adenosin-Monophosphat) gebildet (32,80). Wie dieses Produkt dann zur aktiven Sekretion von Cl^- - und HCO_3^- -Ionen in das Darmlumen führt und eine verminderte Resorption von Na^+ -Ionen hervorruft, ist bisher nicht geklärt.

Nachweis

Seit 1953 dient die sog. Loop-Technik (Darmschlingen-Test) dem Nachweis von Cholera-toxin (16). Aufgrund der Ähnlichkeit des pathogenetischen Prinzips kann diese Technik auch zum Nachweis von E.coli L-Toxin eingesetzt werden. Jedoch handelt es sich um einen unspezifischen Test mit dem auch E.coli S-Toxin (siehe unten) und Toxine, die an Lebensmittelvergiftungen unklarer Genese beteiligt sind, identifiziert werden können.

Technik: Einem etwa 2 kg schweren Kaninchen wird unter Narkose der Bauchraum geöffnet. Durch Abbinden am Dünndarm bildet man unter Schonung der Blutgefäße Segmente von 5 - 10 cm Länge und injiziert die zu prüfenden Toxinpräparation in das Darmlumen. Nach 18 Stunden werden die Tiere getötet. Der Dünndarm wird herauspräpariert und die in den Segmenten angesammelte Flüssigkeit in Beziehung zur Länge des Darmteiles gesetzt.

Bei in vitro-Tests mit Zellkulturen (in Mikrotiterplatten durchführbar) (90, 47) haben zwei Zellarten Eingang in die Diagnostik von E.coli L-Toxinen gefunden:

- Adrenalzellen der Maus (Y1)
- Hamsteroarialzellen (CHO-K1).

Beide Zelltypen reagieren sehr empfindlich auf zyklisches AMP. Monolayer-Kulturen werden mit den zu prüfenden Enterotoxinpräparationen überschichtet. Nach 18 - 24 Stunden Bebrütung kann das Testergebnis abgelesen werden. Die Adrenalzellen bilden in Anwesenheit von L-Toxin zyklisches AMP,

das wiederum die Produktion von Steroiden anregt. Die Zellen werden hierdurch so in ihrer Aktivität gesteigert, daß sie schließlich mit einer Formänderung reagieren: Die ursprünglich spindelförmigen Zellen nehmen runde Gestalt an (21). Dagegen ändern Hamsteroarialzellen in Anwesenheit von L-Toxin ihre Gestalt in umgekehrter Weise: Die sonst rundlichen Zellen werden spindelförmig (45).

In den letzten Jahren sind folgende serologische Tests für den Nachweis von L-Toxin eingesetzt worden:

1. Passive Immunhämolysse. Sie wurde von EVANS u. EVANS (1977b) erstmals beschrieben und von SERAFIM et al. (1979) und de CASTRO et al. (1980) weiterentwickelt.
2. Modifizierter Elek-Test. Dieser Geldiffusionstest ist zum Nachweis der Toxine von Corynebakterium diphtheriae von ELEK (1948) eingeführt und nach Modifikationen von HONDA et al. (1980 u. 1981) für die Identifizierung von E.coli L-Toxin angewendet worden.
3. Staphylokokken-Coagglutination. Das vielfach verwendete Prinzip ist von BRILL et al. (1979) zum Nachweis von E.coli-Toxin adaptiert worden.
4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = ELISA wurde von ENGVALL u. PERLMAN (1972) erstmalig beschrieben und von YOLKEN et al. (1977) als Nachweismethode für E.coli L-Toxin unter Verwendung eines Meerschweinchen-Antikörpers eingeführt. SVENNERHOLM u. HOLMGREN (1978) benutzten zur spez. Bindung des zu identifizierenden Antigens statt dieses Antikörpers GM₁-Gangliosid. BÄCK et al. (1979) verwendeten den GM₁-ELISA, während MERSON et al. (1980) die Yolken-Methode in Feldversuchen eingesetzt haben.

Die Ähnlichkeit in Struktur und Aufbau von E.coli L- und Cholera-Toxin (s.Tab. 1) findet ihren Ausdruck auch darin, daß für die Herstellung von Antisera, die mit L-Toxin reagieren, Choleratoxin als Antigen verwendet werden kann (86).

GUSTAFSSON u. MÖLLBY (1982) stellten Antisera gegen E.coli-L-Toxin eines vom Menschen und je eines vom Schwein isolierten Stammes her. Sie konnten damit jeweils nur die homologen Stämme nachweisen. Das läßt den Schluß zu, daß E.coli L-Toxine vom Schwein und vom Menschen serologisch unterschiedlich sind. Allerdings ist die Reindarstellung von L-Toxin zum

Zweck der Immunisierung bisher noch nicht befriedigend gelöst, so daß unspezifische Reaktionen der Antiseren auftreten.

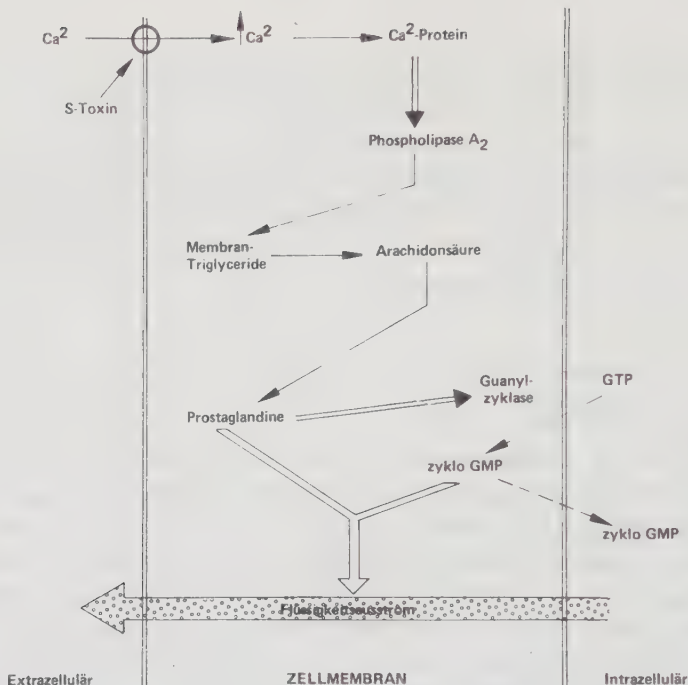
SERAFIM et al. (1979) umgingen dieses Problem, indem sie Cholera-Antitoxin als Antikörper für den Nachweis von E.coli-Stämmen unterschiedlicher Herkunft verwendeten. Dieses ist gerechtfertigt, nachdem auch RAPPAPORT u. BONDE (1981) zeigen konnten, daß Cholera-Antitoxin sowohl Cholera- als auch E.coli L-Toxin neutralisiert.

2.2.3.2 Hitzestabiles Toxin

Struktur und Wirkung

Das S-Toxin ist gekennzeichnet durch ein Molekulargewicht von ca. 4.000. Es wirkt nicht immunogen und ist säurestabil. Im gekühlten Zustand ist es lange lagerfähig und gegenüber proteolytischen Enzymen unempfindlich (22). Als minimale Wirkungs-dosis von gereinigtem S-Toxin für Babymäuse sind 2 ng angegeben (65). Im Tierversuch verursacht es nach kurzer Inkubationszeit verminderte Resorption und eine massive Elektrolytsekretion des Darmepithels. Diese Wirkung wird nicht, wie beim L-Toxin, über eine Aktivierung der Adenylzyklase, sondern der Guanylylzyklase durch vermehrte Bildung von zyklischem Guanosin 3',5'-Monophosphat hervorgerufen (59). Das führt zu einer Hemmung der Aktivität des zyklischen Adenosin 3',5'-Monophosphats (36). Im Vergleich mit dem L-Toxin fällt bei der Wirkung das schnelle Einsetzen und die relativ kurze Dauer der Sekretionssteigerung durch das S-Toxin auf (26).

Nach einer Hypothese von THOMAS u. KNOOP (1982) verändert das S-Toxin die Kalziumkanäle in der Zellmembran. Die Folge davon ist eine erhöhte Kalziumaufnahme der Mucosazellen. Das vermehrt aufgenommene Kalzium wird an Proteine gebunden und führt anschließend zu einer Stimulierung der Phospholipase A_2 , die wiederum zur Bildung von Arachidonsäure aus Membrantriglyceriden beiträgt. Diese ist die Vorstufe für Prostaglandine, die u.a. eine Stimulierung des Guanylylzyklase-Systems bewirken. Daraus resultiert ein erhöhter Spiegel von intrazellulärem zyklischen GMP. Ob dieses und die Prostaglandine allein für den Flüssigkeitsverlust der Zellen verantwortlich sind, bedarf weiterer Aufklärung. Die Zusammenhänge sind in Abb.1 schematisch veranschaulicht.



Modell zur Auslösung des Flüssigkeitsausstromes
durch *E. coli* S-Toxin

(nach Thomas und Knoop, 1982)

IV 19 / 82

Abb. 1

Nachweis

Zum Nachweis des S-Toxins ist man bisher auf Tierversuche angewiesen. Die Loop-Technik kann analog zum Nachweis von L-Toxin eingesetzt werden, jedoch mit dem Unterschied, daß die Reaktion bereits nach 6 Std. beurteilt werden muß (8).

Als geeigneter für den S-Toxinnachweis wird der Baby-Maus-Test (Suckling Mouse Assay) angesehen (17): Neugeborenen Mäusen im Alter von 1 - 4 Tagen wird hierbei bakterienfreier Überstand (0,1 ml) perkutan oder per Sonde in den Magen appliziert. Nach 2 - 4 Std. bei 28° C werden die Tiere getötet und das mit Flüssigkeit gefüllte gesamte Darmkonvolut herauspräpariert. Wenn der Quotient aus Darm- und restlichem Körpergewicht den Wert von 0,083 übersteigt, ist das Ergebnis als positiv zu werten (35,78).

Als neueste Nachweismethode wird ein Radioimmuntest beschrieben, der durch die Kopplung des S-Toxins an bovines Serumalbumin über Carbo-di-

imid ermöglicht wurde (60). Voraussetzung hierfür ist allerdings, daß größere Mengen gereinigten Toxins zur Verfügung stehen, dessen Herstellung z.Z. Speziallabors vorbehalten bleibt (104, 68).

2.2.3.3 Beziehungen zwischen Serotyp und Enterotoxinbildung

Seit Jahren wird ein großer Teil der Enterotoxin-bildenden E.coli-Stämme serologisch identifiziert. Dabei fiel auf, daß bestimmte O-Gruppen bei Schwein, Rind und Mensch gehäuft auftreten. ØRSKOV u. ØRSKOV (1978) fanden bei Schweinen mit Diarrhoe 11 verschiedene O-Gruppen, von denen O 8, O 138, O 141 und O 149 die größte Bedeutung haben. Beim Rind traten hauptsächlich O 8, O 9, O 20 und O 101 als Enterotoxinbildner in Erscheinung, während beim Menschen im Zusammenhang mit Cholera-ähnlichen Durchfällen 17 verschiedene O-Gruppen identifiziert wurden. O 6, O 8, O 15, O 25 und O 78 waren am häufigsten vertreten. Ein Teil der ETEC läßt sich jedoch nicht den bekannten O-Gruppen zuordnen. Somit kann die serologische Identifizierung auch keine sichere Auskunft über eine mögliche Toxinbildung geben. Die O-Gruppen-Typisierung wird daher vor allem für Screeningzwecke und epidemiologische Untersuchungen empfohlen (75).

Größere Bedeutung kommt der Bestimmung der Hüllen(K-)-Antigene zu, da einige dieser Antigene spezifische Haftfaktoren (Pili) von E.coli repräsentieren. Diese Haftfaktoren sind jedoch im Gegensatz zu den aus Polysacchariden bestehenden K-Antigenen aus Proteinen aufgebaut (101). Zudem sind sie nicht chromosomal -, sondern Plasmid-codiert (102). Ihre Proteinstruktur erklärt ihre gute antigene Wirkung. Der pathogenetische Ereignisablauf kann erst nach Haften und Vermehren der Keime an den Dünndarmzotten durch die darauffolgende Toxinproduktion und Anlagerung an die spezifischen Rezeptoren der Darmzellen zur Cholera-ähnlichen Diarrhoe führen (20).

Bei Stämmen von Schweinen mit Durchfall fanden SÖDERLIND u. MÖLLBY (1979) zu 56% das K 88-Antigen, während Stämme von gesunden Kontrolltieren dieses nur zu 1% aufwiesen. Für ETEC vom Schwein sind zwei weitere Antigene bekannt, die MOON et al. (1980) anhand von 107 Stämmen, die das K 88-Antigen nicht hatten, untersuchten. Sie stellten fest, daß 55 Stämme ein bis dahin unbekanntes K-Antigen und 9 Isolate das K 99-Antigen trugen, während 43 Stämme mit keinem der hergestellten Antisera reagierten. Für diese Stämme wird die Existenz noch unbekannter Oberflächenantigene vermutet.

Seit längerem wird das K 99-Antigen als rinderspezifisch angesehen (113). GUINEE u. JANSEN (1979) konnten bei allen von ihnen aus Kälberdiarrhoeen isolierten S-Toxin-bildenden Stämmen das K 99-Antigen nachweisen. Sie halten die Fähigkeit von Coli-Bakterien, dieses Antigen zu produzieren, für einen verlässlichen Indikator der Enterotoxigenität boviner Stämme.

Analoge Untersuchungen beim Menschen führten zur Isolierung von drei Oberflächenantigenen. Das erste Pili-Antigen konnten EVANS et al. (1977a) nachweisen. Sie bezeichneten es als "Colonisation Factor Antigen" (CFA). Dieses Piliantigen läßt sich serologisch gegen Anheftungsfaktoren von aus Tieren isolierten Stämmen (K 99, K 88) abgrenzen. Später fanden diese Autoren ein zweites CFA, das im Gegensatz zur ersten nicht die Fähigkeit besitzt, Erythrozyten der Blut-Gruppe A vom Menschen zu agglutinieren. DENEKE et al. (1981) stellten Antisera gegen drei verschiedene Piliarten her und konnten damit 56% der ETEC-Stämme identifizieren. Die übrigen 44% müssen somit über bisher noch nicht bekannte Haftfaktoren verfügen. Offenbar sind aber auch nicht-toxinbildende Stämme in der Lage, an menschlichen Epithelien zu haften (85).

Zur Herstellung einer wirksamen Vakzine können unterschiedliche Antigene wie gereinigte Enterotoxine, Haftfaktoren, hitzeinaktivierte ETEC oder Choleravibrionen eingesetzt werden (65,86). Dabei wird die perorale Applikation wegen der zu erzielenden guten lokalen Immunität und deren rascher Ausbildung sowie der geringen Gefahr von Impfschäden bevorzugt. Derartige Impfstoffe stehen der Humanmedizin noch nicht zur Verfügung, sind aber in der Entwicklung.

Für die Diagnostik kann der Nachweis von Piliantigenen nur einen Hinweis auf enterotoxinogene Stämme liefern. Ein Beweis der Enterotoxinproduktion ist nur durch den direkten Nachweis von L- oder S-Toxinen möglich, da einige E.coli-Stämme Pili bilden können, ohne Enterotoxinbildner zu sein (5).

2.3 E. c o l i als "L e b e n s m i t t e l v e r g i f t e r"

Der im Sprachgebrauch übliche Begriff "Lebensmittelvergiftungen" umfaßt, soweit Mikroben impliziert sind,

- Infektionskrankheiten durch Erreger, die entweder primär infolge intravitaler Infektion des Tieres oder sekundär über Kontamination aus der Umgebung (Körperausscheidungen von Mensch und Tier, Wasser, Gerätschaften u.a.) in Lebensmittel gelangen können;

- Intoxikationskrankheiten durch Toxine, die entweder im Lebensmittel präformiert oder aber erst im Darm von mit Lebensmitteln aufgenommenen toxinbildenden Mikroben produziert werden:

Die Prinzipien beider Entstehungs- und Erscheinungsformen können, durch bestimmte (meist gramnegative) Erreger verursacht, als sog. Toxi-Infektionen kombiniert auftreten.

Die Zuordnung der durch ETEC hervorgerufenen Darmerkrankungen zu einer dieser Kategorien ist noch nicht sicher erfolgt.

2.3.1 Vorkommen und Verbreitung

ETEC werden seit langem in Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen beim Menschen gebracht. Bereits 1903 wurde vermutet, daß E.coli an Lebensmittelvergiftungen beteiligt sein kann (19). 1923 konnte eine Verbindung zwischen E.coli und Säuglingsdurchfällen hergestellt werden (1). Ab 1940 fand man vermehrt bestimmte Serotypen bei Diarrhoen von Säuglingen und Kleinkindern, die seitdem als klassische Dyspepsie-Coli-Typen bekannt sind (10). Im Jahre 1968 wurden die letzten Zweifel ausgeräumt, daß ETEC für Durchfallerkrankungen nicht nur bei Säuglingen und Kleinkindern, sondern bei Menschen aller Altersklassen verantwortlich sein können. Die Symptome reichen von leichten enteralen Affekten bis zu schweren Cholera-ähnlichen Erscheinungsbildern (91).

Nach Statistiken verschiedener Länder variiert die Beteiligung von E.coli an Lebensmittelvergiftungen zwischen 2% und 10%. Die Streuung ist hauptsächlich auf die jeweiligen Verzehrsgewohnheiten der Bevölkerung und den Stand der Lebensmitteltechnologie und -hygiene zurückzuführen. Die Art des Lebensmittels spielt offenbar eine untergeordnete Rolle: Als Vektoren wurden Fisch, Geflügel, Milch und Milchprodukte, Kaffee-Ersatz und Wasser dokumentiert (nach MEHLMAN et al., 1976).

In tropischen und subtropischen Ländern sind ETEC-Stämme für die Reise-diarrhoe (travellers' diarrhea) verantwortlich (43). Der Massentourismus führt zu einer weltweiten Verbreitung dieser Darmerkrankung.

Bei Routineuntersuchungen von Lebensmittelproben wird z.Z. lediglich auf das Vorhandensein sog. Faecal-Coli oder mit Hilfe der Serotypenbestimmung auf sog. Dyspepsie-Coli geprüft. Mit diesen Methoden lassen sich jedoch enterotoxische E.coli-Stämme nicht feststellen, da sie sich weder bei 44,5°C

vermehrten können, und somit nicht zu den Faecal-Coli gehören, noch mit hinreichender Sicherheit durch Dyspepsie-Seren zu erfassen sind (94). Es ist daher anzunehmen, daß mangels diagnostischer Methoden ein großer Teil der durch E.coli verursachten Lebensmittelvergiftungen unentdeckt bleibt.

Tab. 2 faßt in der Literatur beschriebene durch pathogene E.coli verursachte Lebensmittelvergiftungen zusammen.

Tab. 2: Durch E.coli-Stämme verursachte Lebensmittelvergiftungen			
Lebensmittel	Zahl d. Erkrankten	Referenz	Jahr
Fisch	47	Hobbs et al.	1949
Kaffeeersatz	10	Costin et al.	1964
Wasser	22	Costin et al.	1966
Käse	229	Marier et al.	1973
Reis	300 u. mehr	Sakai et al.	1975
Sahne	29	Hobbs et al.	1976
Mehlspeisen	400 u. mehr	Taylor et al.	1982

SACK et al. (1977) fanden 9% ETEC in 240 Proben unterschiedlicher Lebensmittel (Käse, Wurst, Fisch u.a.). Als Untersuchungsmethoden dienten ihnen der Baby-Maus-Test für den S-Toxin-Nachweis und die Loop-Technik sowie eine Gewebe-Kulturtechnik (Adrenalzellen der Maus) zur L-Toxin-Identifizierung. Unter den 240 isolierten E.coli-Stämmen konnte kein Dyspepsie-Coli gefunden werden. 22 isolierte Stämme waren ETEC (3 S-Toxin, 11 L-Toxin und 8 L-/S-Toxin-Bildner). Die Serotypisierung dieser Keime ergab 11 verschiedene O-Antigene (O 6, O 8, O 9, O 15, O 25, O 45, O 78, O 101, O 141, O 147, O 149), wobei O 149 am häufigsten (7x) auftrat. Eine Beziehung zwischen bestimmten Serotypen und Toxinproduktion (s. auch Kap. 2.2.3.3) ließ sich nicht sichern. Aus einem Experiment mit einem Freiwilligen wurde gefolgert, daß vom Schwein isolierte ETEC in einer Menge von 10^8 /Keimen beim Menschen keinen Durchfall erzeugen (23). Dieses wird mit der Wirtsspezifität der Piliadhäsion begründet (46,20).

Die durch Plasmide codierte Enterotoxinproduktion ist auf empfängliche apathogene Stämme übertragbar (100). Dieses ist epidemiologisch von Bedeutung, zumal ETEC auch in Flüssen und Trinkwasserbehältern festgestellt werden konnten (94,88).

Neuere Untersuchungen geben zu der Annahme Anlaß, daß ETEC besonders zusammen mit Rotaviren schwere Durchfallerkrankungen auslösen. In den Entwicklungsländern sollen dieser Erregerkombination pro Jahr 5 - 10 Mill. Kinder zum Opfer fallen, wobei der Anteil der Lebensmittel als Vektoren nicht bekannt ist (BLACK et al., 1981).

2.3.2 Symptomatik

Die klinischen Möglichkeiten zur Differentialdiagnose von Gastroenteritiden unterschiedlicher Genese sind begrenzt. Nach einer Schätzung bleiben in bis zu 80% der Fälle auch die Ursachen der Erkrankung ungeklärt (42). Nach SATTERWHITE et al. (1978) sind ca. 10^8 Keime als dosis infectiosa minima erforderlich, um beim Erwachsenen Diarrhoe-Symptome auszulösen. Andererseits verfügen enterotoxische E.coli-Stämme über Anheftungsfaktoren, die zumindest die Möglichkeit einer Infektion auch bei wesentlich geringeren Keimzahlen denkbar erscheinen lassen.

Die während einer Lebensmittelvergiftung durch Genuß von Camembert, Brie und Coulommiers bei 229 Patienten aufgetretenen Symptome sind in Tab. 3 aufgeführt:

Tab. 3: Prozentuale Häufigkeit von Symptomen nach einer durch E.coli verursachten Lebensmittelvergiftung (nach MARIER et al., 1973)				
Symptome	Anzahl d.Pers.	%	mittlere Dauer in Tagen	
Durchfall	204	88	2	(1-15)
Fieber	166	72	1	(1- 7)
Übelkeit	163	71	1	(1- 5)
Krämpfe	151	66	1-2	(1- 7)
Schüttelfrost	88	38	1	(1- 3)
Erbrechen	80	35	1	(1- 3)
Unwohlsein	77	34	4	(1-42)
Gliederschmerzen	63	28	1	(1- 7)
Kopfschmerzen	16	7	1	(1- 7)

Die Symptome traten im Mittel 18 Stunden nach Genuß des Camembert auf und dauerten ca. 2 Tage an. Zwischen der Menge des verzehrten Käses und der Schwere der Erkrankung konnte keine Korrelation ermittelt werden. Das durchschnittliche Alter der Erkrankten lag bei 34 Jahren; die Verteilung auf die Geschlechter war etwa gleich. Todesfälle traten nicht auf.

Die aus dem Camembert isolierten E.coli-Stämme wurden auf ihre Invasionsfähigkeit und Enterotoxinbildungsvermögen geprüft. Am häufigsten wurde E.coli-Serotyp O 124 gefunden, der sich als enteroinvasiv erwies. Die Symptome zweier Patienten unterschieden sich deutlich von denen der anderen Erkrankten durch auffallend große Mengen wässrigen Stuhls ohne Erhöhung der Körpertemperatur. Hier dürfte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen ETEC-Stamm gehandelt haben (73).

2.4 E. coli in Milchprodukten

Die Wachstumsbedingungen von E.coli in Milchprodukten sind bei der üblichen Aufbewahrungstemperatur im wesentlichen von deren jeweiliger physikalischen Struktur und chemischen Zusammensetzung (insbesondere von pH-, rh-, a_w -Wert, Nährstoffgehalt, antimikrobielle Bestandteile) abhängig. Tab.4 zeigt die Ergebnisse der E.coli-Titerbestimmung aus süßer Sahne und fermentierten Milchprodukten nach einer noch unveröffentlichten Enquete des Instituts für Hygiene an der Bundesanstalt für Milchwissenschaft. Die untersuchten Proben sind in 26 gleichmäßig über die Bundesrepublik Deutschland verteilten Orten aus dem Handel entnommen. Als Nährmedium diente eine Brillantgrün-Laktose-Lösung (Oxoid CM 31). Die Inkubation erfolgte bei 48 h/44,5 $\pm$ 1°C.

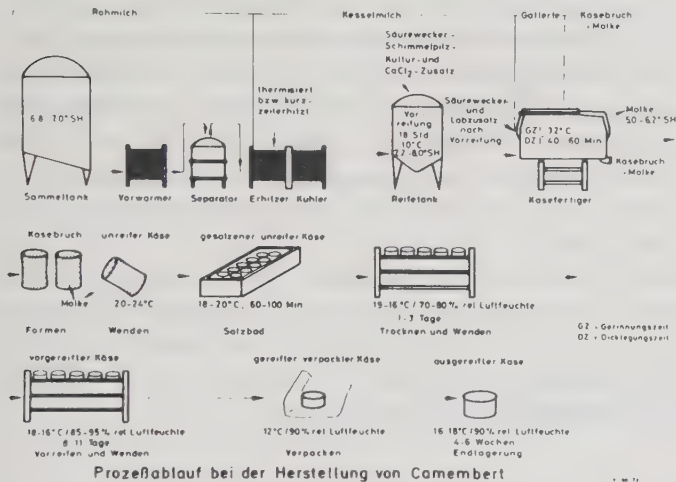
Tab. 4: Ergebnisse der E.coli-Titerbestimmung bei süßer Sahne und fermentierten Milchprodukten

ml	Süße Sahne (ml) n = 324 n $\leq$ %	Saure Sahne (ml) n = 334 n $\leq$ %	Joghurt (ml) n = 361 n $\leq$ %	Buttermilch (ml) n = 298 n $\leq$ %
1 -	319 98,5	329 98,5	354 98,1	289 97,0
1 +	1 98,8	2 99,1	6 99,7	4 98,3
10 ⁻¹ +	1 99,1	3 100	0 99,7	3 99,3
10 ⁻² +	3 100		1 100	2 100
10 ⁻³ +				
g	Quark (g) n = 317 n $\leq$ %	Camembert (g) (Mittelzone) n = 191 n $\leq$ %	Camembert (g) (Randzone) n = 191 n $\leq$ %	
10 ⁻¹ -	316 99,7	108 56,5	97 50,8	
10 ⁻¹ +	0 99,7	29 71,7	14 58,1	
10 ⁻² +	0 99,7	15 79,6	22 69,6	
10 ⁻³ +	1 100	11 85,3	19 79,6	
10 ⁻⁴ +		25 98,4	34 97,4	
10 ⁻⁵ +		0 98,4	1 97,9	
10 ⁻⁶ +		3 100	3 99,5	
10 ⁻⁷ +			1 100	

In süßer und saurer Sahne, Joghurt, Buttermilch und Quark liegt der Prozentsatz der in 1 ml bzw. 0,1 g E.coli-negativen Proben zwischen 97,0% und 99,7%.

Bei Camembert beträgt der Prozentsatz der in 0,1 g E.coli-negativer Proben 56,5% (Mittelzone) bzw. 50,8% (Randzone). Es wurden bei Camembert noch in 10⁻⁶ g (Mittelzone) bzw. 10⁻⁷ (Randzone) positive E.coli-Befunde ermittelt.

Besonders günstige Wachstumsbedingungen bieten offensichtlich Weichkäse vom Camembert-Typ. Dieses erklärt sich aus der Herstellungsweise, die in Abb. 2 veranschaulicht ist.



(nach Tolle und Otte, 1981)

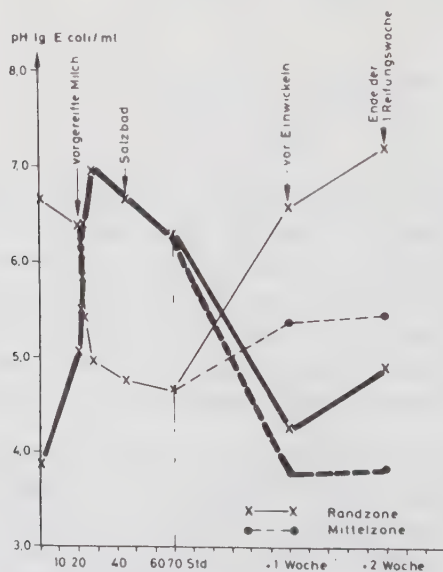
Abb. 2

Sammlung der Käseereimilch, Vorwärmung, Zentrifugation, Thermisieren bzw. schonendes Pasteurisieren, Vorreifung nach Zugabe einer geringen Menge der Starterkultur, Einlabung und Koagulation nach vollständiger Zugabe der Starter, Bruchbereitung, Abfüllen des Bruches in Formen, mehrfaches Wenden, Salzbad, Trocknen, Wenden, Reifen und Verpacken sind die wesentlichen technologischen Schritte des Prozessablaufes. Durch die Labgerinnung wird das Casein für den mikrobiell-enzymatischen Abbau vorbereitet.

Im Bruch dominieren rasch die zugesetzten Starterkulturen (*Sc.lactis*, *Sc. diacetylactis*, *Sc.cremoris*, *Leuconostoc*-spp., ggf. *Lactobacillus*-spp.) und erreichen etwa 10^7 bis 10^9 kbE/g. Sie fermentieren Laktose zu Milchsäure und führen somit zu pH-Werten von ca. 4,8. Lactobazillen folgen den Streptokokken auf quantitativ niedrigerem Niveau. Auf der Oberfläche entwickeln sich nach dem Salzbad vom 3. Tag ab *Oospora lactis*, *Torulopsis*-, *Candida*-, *Saccharomyces*-, *Debaryomyces*-spp. u.a. bis zu 10^8 bis 10^{10} /g Rindenmasse, im Inneren bis zu 10^4 bis 10^5 /g, um dann ab etwa 10. Tag wieder abzunehmen. Sie oxydieren die Milchsäure, spalten Milchl fett, wirken proteolytisch

und tragen somit wesentlich zur Aromabildung bei. Der zugesetzte Camembertschimmel (*Penicillium candidum/camemberti*) bildet ca. 3 - 4 Tage nach der Herstellung ein Mycel, das als geschlossener feiner Flaum nach 10 Tagen zu ca. 10^8 Schimmelpilzen/g heranwächst. Eine intensive Proteolyse führt zum pH-Anstieg auf etwa 6,5. Mit zunehmendem pH wird auch die Lipase aktiviert, die bei pH 8,0 ihr Optimum hat. Im Synergismus und Antagonismus zur übrigen Flora wird der gewünschte Flavour erreicht. Die Metabolite diffundieren von der Oberfläche in das Innere. Im späteren Stadium der Reifung, nach der Entsäuerung, vermehrt sich auf der Camembertoberfläche eine z.T. pigmentierte bakterielle Flora, überwiegend aus Mikrokokken und *Brevibacterium linens* sowie anderen coryneformen Bakterien bestehend (TOLLE et al., 1980).

Nach der Wärmebehandlung kann die Kesselmilch evtl. durch vereinzelte kaum nachweisbare *E.coli* rekontaminiert werden. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, vermag *E.coli* sich in den ersten 6 Stunden des Camembert Herstellungsprozesses um mehrere Zehnerpotenzen zu vermehren und so zu hygienisch bedenklichen Größenordnungen heranwachsen.



Entwicklung von *E.coli* (—) während der Camembert-Herstellung in Abhängigkeit vom pH-Wert (—) (exp. Kontamination der Kesselmilch mit 10^3 /ml)

19 80/75

(nach Tolle und Otte, 1981)

Abb. 3

Nach dem Salzbad und mit fallendem pH nehmen die E.coli-Werte zwar ab, steigen jedoch später wieder konform mit dem Anstieg des pH-Wertes.

Die hohen E.coli-Werte im reifen Camembert sind bei der üblichen Herstellungspraxis nicht unbedingt auf eine mangelhafte Sorgfalt zurückzuführen, denn nur vereinzelt in der Kesselmilch vorkommende Keime können sich herstellungsbedingt zu solchen Größenordnungen vermehren, die weit oberhalb eines hygienisch akzeptablen Standards liegen (TOLLE et al., 1981),

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Referenzstämme

Als Referenzstämme dienten folgende E.coli-Stämme*)

LT-positive Stämme:

1. O8 K100
2. O8 K83 H21
3. O8 K201 H4
4. O8 K? K88
5. O20 K? K88 (nm)

isoliert vom:

Schwein
"
"
"
"

ST-positive Stämme:

1. O101 K(A)30 K99
2. O101 K(A)28 K99
3. O9 K(A)? K99
4. O20 K? K99
5. O9 K85 K99
6. O9 K(A) 101 (nm)
7. O_x46 K(A) 103 (nm)
8. O101 K(A) 30
9. O7 K-

Kalb

"
"
"
"

Schwein

"
"
"

LT/ST-positive Stämme:

1. O9 K204 K88
2. O149 K91 K88
3. O8 K87 K88
4. O149 K91
5. O138 K81 K88

Schwein

"
"
"
"

Als Toxin-negative Kontrollstämme dienten:

1. O45 K-
2. O112 AB K68
3. O126 K 71
4. O20 K-
5. O64 K-
6. O78 K80
7. O88 K-
8. O103 K-
9. O152 K-

Einen weiteren L-/S-TOXIN-positiven Stamm, der aus Stuhl eines Durchfallpatienten in Bangladesh isoliert wurde, stellte Prof. Bockemühl, Hamburg, zur Verfügung. Nr. 10407: O78 H11 CFA I (Colonisation Factor Antigen I)

Das Referenzmaterial wurde so ausgewählt, daß jeder Serotyp nur jeweils mit einem Stamm vertreten war. Aus diesem Grund wurden im folgenden die Serotypenkennzeichnungen für die Benennung der Referenzstämme verwendet.

*) Sämtliche Stämme wurden dankenswerterweise von Herrn P.A.M. GUINEE, Bilthoven, Niederlande, überlassen

3.1.2 Feldstämme

52 Feldstämme wurden aus Milchprodukten, vor allem Camembert, isoliert. 105 Stämme stellten die Staatlichen Veterinäruntersuchungsämter Hamburg, Münster, Gießen, Hannover und Kassel, das Staatliche Tierärztliche Untersuchungsamt Aulendorf, die Tiergesundheitsämter der Landwirtschaftskammern Weser-Ems und Hannover sowie das Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern in München zur Verfügung.

3.1.3 Lebensmittel

Das Probenmaterial wurde nach dem Zufallsprinzip aus dem freiem Handel in Kiel gezogen.

3.1.4 Versuchstiere

1. Mäuse:
NMRI-Auszucht (ZIV, Hannover)
21 Weibchen und 3 Böcke wurden gehalten, um pro Woche etwa 50 - 70 Babymäuse für den S-Toxin-Nachweis zur Verfügung zu haben.
2. Kaninchen zur Antiserum-Gewinnung:
Je 1 Kaninchen (Privatzucht) zur Immunisierung mit
 1. Cholera-Toxin (Volltoxin)
 2. Cholera-Toxin (B-Subunit).

3.1.5 Anzüchtungs- und Isolierungsmedien (siehe ANHANG)

1. Anreicherungsmedien
 - A. Nährbouillon
 - B. Enterobacteriaceae-Anreicherungsmedium (E.E-broth)
2. Selektivmedien
 - A. Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar (VRB = Violett-Red-Bile)
 - B. Eosin-Methylenblau-Laktose-Agar (EMB)
3. Standardmedium für die Toxinproduktion:
(CAYE-2-Bouillon)
(CAYE-Casamino Acid-Yeast-Extract-Salts-Medium)
4. Anzüchtungsmedium für die experimentelle Inokulation von Milch und Milchprodukten
Caseinpepton Sojamehl-Bouillon (TSB = Trypticase Soy Broth)
5. Medium für die Radialdiffusion nach MANCINI

3.2 Methoden

3.2.1 Kulturelle, biochemische und serologische Differenzierung

Kultur: E.coli-Kolonien sind auf EMB-Agar an ihrem grünlichen Metallglanz im reflektierten Licht und an ihrem blau-schwarzen Zentrum im durchfallenden Licht zu erkennen. Auf VRB-Agar bilden Laktose-positive Enterobacteriaceae wie E.coli rötliche bis purpurrote Kolonien mit einem Präzipitationshof.

Biochemie: Die biochemische Identifizierung der isolierten Stämme wurde mit dem API-20 E (Enterobacteriaceae)-System vorgenommen. Um eine größere Zahl von Merkmalen zu erfassen, wurden alle Referenzstämme im API-50 E-System überprüft. Die Untersuchung der Stämme im Verhalten gegenüber biochemischen Merkmalen, die normalerweise nicht berücksichtigt werden, hatte den Sinn, eine Unterscheidungsmöglichkeit von Enterotoxin-bildenden Stämmen und Enterotoxin-negativen Stämmen zu finden, zumal aus der Literatur Ansätze dieser Art bekannt sind (28). Durch die gemeinsame Auflistung der Ergebnisse aus dem API-20 E und dem API-50 E ergeben sich insgesamt 60 untersuchte biochemische Merkmale, von denen nach orientierenden Voruntersuchungen 9 (s.Tab. 6) berücksichtigt wurden.

Serologie: Die serologische Differenzierung der Referenzstämme ist von Herrn P.A.M. Guinée, Bilthoven, vorgenommen worden. Dabei standen 183 Anti-O-Seren, 85 Anti-K-Seren und 49 Anti-H-Seren zur Verfügung (113). Die aus Milchprodukten isolierten E.coli-Stämme wurden in der Objektträger-agglutination auf verschiedene K-Antigene geprüft. (Anti-OK(B,L)-Testsera, Behringwerke AG, Marburg).

3.2.2 Identifizierung von L-Toxin-Bildnern

Auf ihre Anwendbarkeit wurden überprüft:

- ELISA-Test
- Staphylokokken-Coagglutination
- Mancini-Radialdiffusion
- ELEK-Test

All diesen Methoden sind folgende vorbereitende Arbeitsgänge (1-4) gemeinsam:

Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung von Antiseren:

Als Antigen diente Cholera-Toxin bzw. Toxoid (Sigma, München), da E.coli-L-Toxin nicht kommerziell erhältlich ist und beide Toxine immunologisch weitgehend identisch sind (56, 86, 115).

1. Herstellung der Vakzine: Cholera-Toxin lösen in 0,5 ml physiologischer NaCl und emulgieren in 0,5 ml inkomplettem Freund'schen Adjuvans (Difco) und 0,5 ml Alu Gel (Serva, Heidelberg).
2. Impfschema: Erste Impfung mit 50 µg Cholera-Toxin, zweite, dritte und vierte Impfung im Abstand von 14 Tagen mit 100, 150 bzw. 200 µg Cholera-Toxin im Volumen von ca. 1,5 ml, subkutan.
3. Serumgewinnung: 7 Tage nach der letzten Impfung Blutentnahme durch Herzpunktion. Sterilfiltrieren des Serums (0,45 µm-Filter) und konservieren bei -20° C. Weitere Herzpunktionen jeweils eine Woche nach Boosterimpfung von 200 µg Cholera-Toxin je Tier.
4. Antikörperbestimmung (ELISA): Durchführung des ELISA wie auf S.24 beschrieben mit folgenden Modifikationen:
 - A. Perlen in Cholera-Toxin-Lösung (1 µg/ml) in 0,1 M PBS, pH 7,0 schütteln.
 - B. Verdünnungsreihe von Cholera-Antiserum herstellen (1 : 200 bis 1 : 3,2 Mill.).
 - C. Kontrolle: Kaninchen-Normalserum (1 : 200).

Für die Cholera-Antiseren ergab sich im Mittel ein Antikörpertiter von 1 : 200 000.

Optimalmedium zur Anregung der Enterotoxin-Produktion

(nach MUNDELL et al., 1976):

Als Standardmedium für die Anregung der Toxinproduktion von E.coli-Stämmen hat sich international die von MUNDELL et al. (1976) geprüfte CAYE-2-Bouillon durchgesetzt. Sie liefert sowohl für den S-Toxin- (35) als auch für den L-Toxin-Nachweis (31) zuverlässige Ergebnisse.

Zu beachten ist eine ausreichende Belüftung während der Inkubation (Verhältnis von Kolben- und Flüssigkeitsvolumen 10 : 1, auf einem Rundschüttler mit 150 U/min).

1. Eine Öse Bakterienkultur von frischer Blutplatte in 12 ml CAYE-2-Bouillon suspendieren (300 ml Erlenmeyerkolben).
2. 18 - 24 h auf Rundschüttler (150 Umdrehungen/min) bei 37° C inkubieren.
3. Bouillon bei 3000 g für 15 min zentrifugieren.
4. Etwa 1 ml Überstand für den S-Toxin-Nachweis (Babymäuse) abgießen. Rest des Überstandes (ca. 10 ml) für den L-Toxin-nachweis (ELISA) aufbewahren.

Herstellung des Konjugats

(nach AVRAMEAS et al., 1978):

1. Inhalt von 1 Flasche alkalischer Phosphatase*) (suspendiert in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in kleinem Röhrchen möglichst kalt 10 Minuten zentrifugieren (3000 g).
2. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes mit Mikrospritze.
3. Sediment in 1,0 ml PB aufnehmen und über Nacht gegen PB (0,1 M, pH 6,8) dialysieren.
4. Zugabe von 0,3 ml Anti-Kaninchen-Immunglobulin vom Schwein**).
5. 100 µl Glutaraldehyd (1%) unter ständigem Rühren zugeben (3 h/20°C).
6. Zugabe von 0,2 ml Lysin-HCL (1 M, pH 7,0) 2 h/20°C inkubieren, über Nacht gegen PBS 0,01 M dialysieren.
7. Abzentrifugieren nicht gelöster Substanzen, Zugabe von 1 ml PBS, 5% BSA und 0,001 M MgCl_2 .

Durchführung des ELISA-Tests:

(große Buchstaben kennzeichnen die Reaktionsstufen des Schemas Abb. 4)

- A. Polystyrol-Perlen (Precision Plastic Ball Co., Chicago) (ca. 12 h/20°C in 20 ml Gangliosid-Lösung***) (1,5 µM GM_1 -Gangliosid 0,1 M PBS, pH 7,0) auf Rundschüttler (ca. 150 U/min)¹ inkubieren.
Perlen 3-mal in Tween-NaCl waschen.
- B. Abdecken freier Bindungsstellen auf den Perlen durch Schütteln in 1%igem HSA-Puffer (1% humanes Serumalbumin****), 5% Tween 20, 0,02% Natrium Acid in 0,1 M PBS, pH 7,0).
Perlen 3-mal in Tween-NaCl waschen.
- C. Je 3 Perlen pro Stamm in einem 25 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 10 ml E.coli-Überstand 6 h/20°C schütteln (150 U/Minute).
Standard: Verdünntes Cholera-Toxin in 0,1 M PBS, pH 7,0
(100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng und 0 ng/ml)
Perlen 3-mal in Tween-NaCl waschen.
- D. Zugabe von 7 ml Cholera-Antiserum (1:200 in 0,1 M PBS, pH 7,0), 12 h/20°C schütteln bei 150 U/min.
Perlen 3-mal in Tween-NaCl waschen.

*) Fa. Seromed, München

**) Fa. Behringwerke, Marburg

***) Fa. Sigma, Prod.-Nr. P 4502

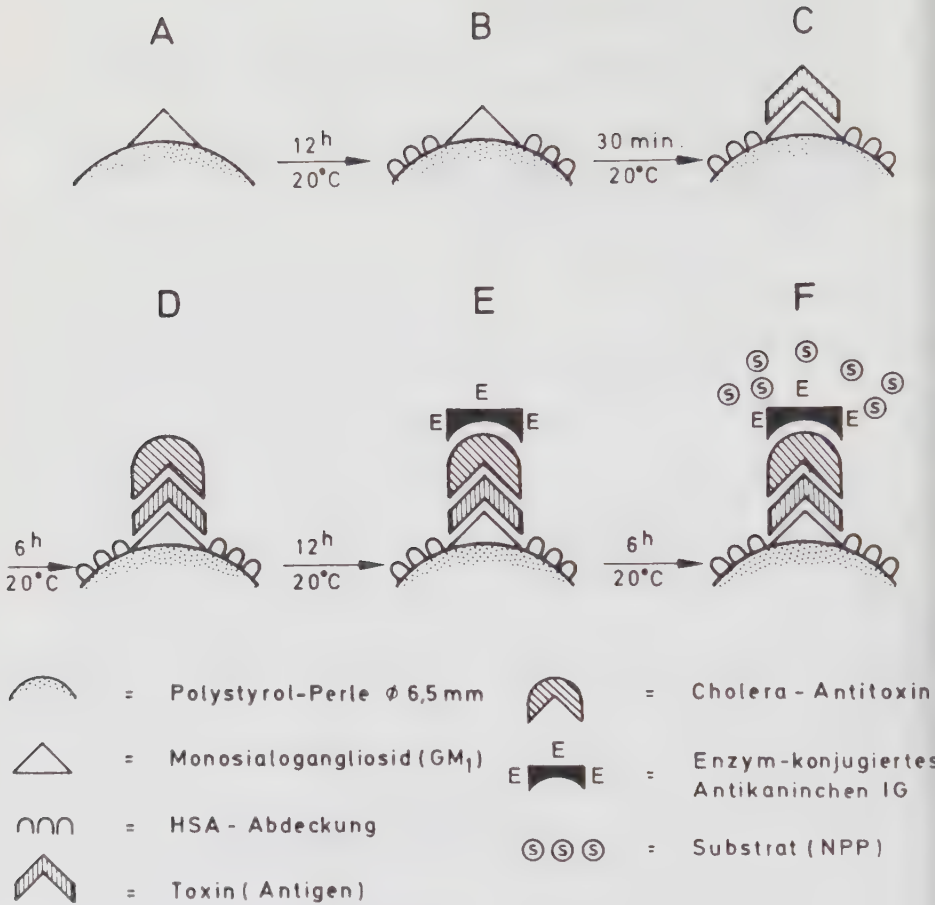
****) Fa. DAKO-Immunglobulins a/s,
Deutschland-Vertrieb: Fa. Boehringer Ingelheim, München,
Best.-Nr. Z 196

- E. Zugabe von 7 ml Konjugat (1:2000 verdünnt in 0,1 M PBS, pH 7,0).
6 h/20°C schütteln bei 150 U/min.
Perlen 3-mal in Tween-NaCl waschen.
- F. NPP (4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz, Firma Merck) in 0,05 M Karbonat-Puffer, pH 9,8 lösen (1 mg/ml) und á 1,3 ml in Plastikröhrchen ($\varnothing$ 1,0 cm) abfüllen und je Röhrchen 1 Perle zugeben.

Leerwert: NPP-Lösung ohne Perle

Reaktion nach 60 min/20°C durch Zugabe von 100 μ l 2 N NaOH stoppen und Reaktionsgemisch aufschütteln (Mixomat).

Messung der Extinktion bei 405 nm.



Schematische Darstellung des Nachweises von E.coli L-Toxin mit Hilfe der ELISA-Technik

(mod. nach Yolken u. Mitarbeiter, 1977)

Staphylokokken-Coagglutination (11,62,63,66):

A. Präparation des Cowan-I-Stammes:

1. Inokulation einer Einzelkolonie von Blutagar (18 h/37°C) in 500 ml TSB.
2. Inkubation (24 h/37° C) auf Rundschüttler (150 U/min).
3. Zentrifugation (3000 g).
4. Bakterien 3-mal in PBS (0,1 M; pH 8,5) waschen.
5. Bakterien in PBS so aufnehmen, daß das Sediment etwa 10 Vol.% ausmacht, 5% Formalin (entspricht einer Endkonzentration von 2% Formaldehyd) zugeben und für 3 h/37° C leicht schütteln.
6. 3-mal in PBS waschen.
7. Sediment, 10 - 20 Vol.%ig in PBS, bis zu 8 Wochen bei 0 - 5° C lagerungsfähig.

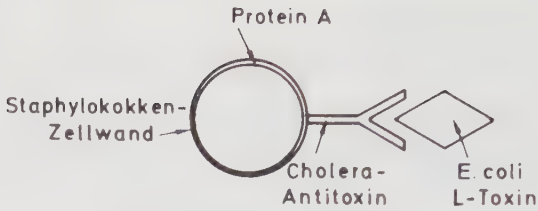
B. Präparation der Agglutinationssuspension:

1. Zugabe von 100 µl Cholera-Antiserum zu 1 ml Cowan-I-Suspension in einem mit Schraubverschluß versehenen Reagenzglas, auf 2 ml mit PBS (0,1 M, pH 8,5) auffüllen.
2. Inkubation (12 h/20° C) auf Rundschüttler (100 U/min).
3. Zentrifugation (3000 g) und Aufnehmen des Sediments in 2 ml PBS (0,1 M; pH 8,5).

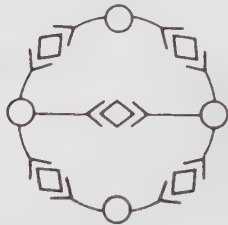
C. Durchführung des Agglutinations-Tests:

1. 25 µl E.coli-Überstand und 25 µl sensibilisierte Cowan-I-Suspension auf entfettetem Objektträger mit Mikropipettenspitzen verrühren.
2. Durch Schwenken des Objektträgers homogene Mischung herstellen.
3. Bewertung:

Agglutination: - innerhalb einer Minute mit völliger Klärung der Suspension	+++
- innerhalb von zwei Minuten mit weitgehender Klärung der Suspension	++
- nach über zwei Minuten, aber noch deutlich erkennbar	+



Coagglutination:



Prinzip der Staphylokokken-Coagglutination (nach Brill und Mitarbeitern, 1979)

IV 7/82

Abb. 5

Agargel-Radialdiffusion (nach MANCINI et al. 1965):

1. Vor Gebrauch Agar verflüssigen, auf ca. 40°C abkühlen lassen und Cholera-Antiserum zugeben (1:200).
2. 12,4 ml Agar auf großem Objektträger (7 x 10 cm) ausgießen.
3. Löcher mit Teleskopstanzkanüle (Firma Behring) ausstanzen.
4. Toxinlösung in verschiedenen Konzentrationen (z.B. 5; 2,5; 1,25; 0,625 ... µg/ml) oder E.coli-Überstand à 5µl pro Loch einfüllen.
5. 48 h/20°C in feuchter Kammer inkubieren.

Trocknen und Färben:

1. Feuchtes Filterpapier direkt auf Agarschicht und dicke Schicht trockenes Filterpapier darüberlegen, 10 min pressen (ca. 5 kg), Filterpapier vorsichtig abheben (evtl. anfeuchten).
2. Ca. 15 min mit Fön/trocknen.

3. 15 - 20 min mit Färbelösung bedecken (0,5%ige Coomassie-Brillantblau R 250 (Firma Merck) als Stocklösung 1:5 verdünnen mit Äthanol (96%) 45%, Eisessig 10%, Aqua dest. 45% als Gebrauchslösung).
4. Entfärben (2 - 3 min) mit Verdünnungslösung.
5. Ausmessen der Präzipitationszonen, Auftragen der Regressionsgeraden gegen die Enterotoxin-Konzentration.

Modifizierter ELEK-Test (nach HONDA et al., 1981)):

Voraussetzung: Herstellung gereinigter Cholera-Anti-Immunglobuline

1. IG-G-Fraktion von Cholera-Antiserum an Protein-A Sepharose CL-4B (Fa. Pharmacia) binden und Elution der Fraktion mit Glycin-HCl-Puffer (0,1 M, pH 3,0).
2. Dialysieren gegen PBS (0,01 M, pH 7,0).
3. Lyophilisieren und Aufnehmen in Aqua dest.
4. Bestimmen des Proteingehaltes nach der Methode von LOWRY (modifiziert nach E.F. HARTREE, 1972).

Ablauf des ELEK-Tests (24,57,58):

1. Die Stämme auf festem CAYE-2-Medium (Zusatz von 1,5% Noble Agar, Difco) für 40 h/37°C anzüchten.
2. Filterpapier (Ø 6 mm) mit 25 µl Polymyxin B-Lösung (20.000 IU/ml) tränken, auf Einzelkolonien legen und für 8 h/37°C inkubieren.
3. 30 µl gereinigte Immunglobuline (4 mg/ml Protein) in eine 4 mm große Vertiefung in 5 mm Entfernung von der Kolonie einfüllen.
4. Platte für 12 h/37°C inkubieren und auf Vorhandensein einer Präzipitationslinie prüfen.

3.2.3 Identifizierung von S-Toxin-Bildnern

Der Baby-Maus-Test (BMT) oder Suckling Mouse Assay (SMA) zur Identifizierung von hitzestabilem Escherichia coli Enterotoxin (ST) wurde von DEAN et al. (1972) erstmals beschrieben und hat sich seitdem in einer großen Anzahl von Untersuchungen bewährt.

Zur Durchführung des Tests (35):

1. Anzüchtung der Stämme in CAYE-2-Medium
2. Zentrifugation (3.000 g/20 min). Ca. 1 ml Überstand mit einem Tropfen 2%-iger Evans-Blau-Lösung (Fa. Merck) anfärben
3. Injektion von 0,1 ml pro Babymaus (1 - 4 Tage alt) perkutan in den milchgefüllten Magen (Kanüle No. 20, 0,4 x 21 mm)

4. "Inkubation" der Babymäuse 4 h/28°C
5. Töten der Tiere mit Chloroform, Herauspräparieren und Wiegen des Darmkonvoluts sowie des restlichen Körpers
6. Auswertung nur der Tiere, die einen blau angefärbten Mageninhalt aufweisen (pro Stamm mindestens drei Babymäuse)
7. Berechnung:
Quotient aus Darmgewicht und restlichem Körpergewicht muß im positiven Fall größer als 0,083 sein

Beispiel:

$$\frac{\text{Gewicht des Darmkonvoluts}}{\text{Gewicht des Restkörpers}} = \frac{0,13}{1,86} = 0,070 \quad (\text{negatives Ergebnis})$$

$$\frac{\text{Gewicht des Darmkonvoluts}}{\text{Gewicht des Restkörpers}} = \frac{0,18}{1,56} = 0,115 \quad (\text{positives Ergebnis})$$

Für die vorliegende Untersuchung wurden 21 Weibchen und 3 Böcke gehalten, um wöchentlich 50 - 70 Babymäuse zur Untersuchung von 10 - 15 Stämmen zur Verfügung zu haben.

Nach Anzüchtung der Referenzstämme in CAYE-2-Bouillon (24 h/37°C) und Zentrifugation ließ sich der Überstand ohne Verlust der Toxinaktivität bei -20°C über Wochen lagern. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die zu untersuchenden Keimüberstände erst dann auf Toxinanwesenheit zu prüfen, wenn eine ausreichende Anzahl von Babymäusen im geeigneten Alter vorhanden ist, so daß der Zeitpunkt des Tests auf die biologisch bedingte Verfügbarkeit der Babymäuse eingerichtet werden kann.

MOON et al. (1978) schlugen vor, die Babymäuse statt bei 28°C nach Injektion des Überstandes bei 37°C für 4 Stunden zu halten. Diese Behandlung führt zu einer Diarrhoe, deren Ausmaß dann ohne Sektion der Mäuse, Wiegen des Organs und Berechnen des Faktors direkt zu beurteilen ist (Reaktionssymbole von 0 - 4). Diese Methode hat sich bisher nicht durchgesetzt. Ihr Nachteil liegt offenbar in der Ungenauigkeit des Ablesens der Reaktion und im Fehlen von Vergleichswerten, wie sie in der Erstpublikation des BMT beschrieben sind.

Babymäuse, die für einen Test benutzt werden, sollten zwischen 1 und 4 Tagen alt sein. Sind sie jünger als 24 Stunden, kommt es nach Injektion von 0,1 ml Keimüberstand häufig zu einer Ruptur der noch sehr dünnen Magenwand. Bei über 4 Tage alten Tieren läßt die Toxinwirkung nach (78). Die Größe der Mäuse ist auch abhängig von der Größe des Wurfes. Bei Würfen mit weniger als 10 Tieren nehmen diese wesentlich schneller zu als bei

Würfen mit 15 und mehr, so daß man bei großen Würfen Babymäuse mit einem Alter von 5 Tagen noch verwenden kann. Generell sollten die Mäuse ein Gewicht von 3,5 g nicht überschreiten, um für einen Test voll geeignet zu sein.

Die Jungen müssen bis kurz vor Durchführung des Baby-Maus-Tests beim Muttertier bleiben, um möglichst viele Tiere mit milchgefülltem Magen anzutreffen. Wenn der Magen schlecht oder gar nicht zu sehen ist, bleibt ein Injektionsversuch meist erfolglos, da die schlaffe Magenwand vor der Nadel ausweicht. Solche Tiere können problemlos zu einer milchgebenden Maus zurückgesetzt werden, um am nächsten Tag zur Verfügung zu stehen.

Das Darmgewicht der Babymäuse nach der Inkubation mit dem Überstand eines Toxin-negativen Keimes liegt zwischen 0,09 g und 0,19 g, die korrespondierenden Restkörpergewichte schwanken zwischen 1,45 und 2,97. Bei Anwesenheit von S-Toxin im Überstand sind Darmgewichte von 0,16 bis 0,29 anzutreffen, bei einem gleichzeitig geringeren Restkörpergewicht von 1,24 bis 2,47.

OLSSON und SÖDERLIND (1980) fanden bei den von ihnen untersuchten E.coli-Stämmen eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen im Baby-Maus-Test und der Loop-Technik, während andere Untersucher bei Stämmen vom Schwein zwei verschiedene S-Toxine feststellten, von denen das eine mit dem Baby-Maus-Test nicht nachweisbar war (79). Für die Diagnose von S-Toxin-bildenden E.coli-Stämmen vom Menschen gibt es z.Z. kein Tiermodell, das zuverlässiger ist und eine bessere Wiederholbarkeit aufweist als der Baby-Maus-Test.

3.2.4 Isolierung und Quantifizierung von E.coli aus Untersuchungsmaterial

- Isolierung:

1. 25 g Untersuchungsmaterial mit 225 ml Nährbouillon (Nutrient-broth) homogenisieren.
2. 6 h/37° C im Wasserbad bebrüten.
3. 0,1 ml vom Homogenat zur Subkultivierung in 30 ml Enterobacteriaceae-Anreicherungsmedium überpipettieren.
4. Nach 18 h je eine Öse auf EMB- und VRB-Agar ausstreichen (24 h/37° C).
5. Typische Einzelkolonien auf Blutagarplatten überimpfen (24 h/37° C) und mit dem Api 20 E identifizieren.

- Quantifizierung coliformer Bakterien und sog. Faecalcoli

(mod. nach IDF-Standard 73, 1974):

1. 10 g Untersuchungsmaterial steril entnehmen und mit 90 ml Peptonwasser (0,1%-ig) homogenisieren.
2. Homogenat in 10er Schritten weiter verdünnen bis 10^{-7} .
3. Je Verdünnungsstufe 4 x 1 ml in Petrischalen pipettieren und mit 7 ml 40°C-warmen VRB-Agar vermischen.
4. Nach dem Erstarren mit 5 ml VRB-Agar überschichten.
5. Inkubation: 1 Serie (Doppelansatz) 24 h/30°C zur Untersuchung auf coliforme Bakterien; 1 Serie (Doppelansatz) 24 h/44,5°C für Untersuchung auf Faecalcoli.
6. Auszählen der typischen Kolonien und gefundene Zahl multiplizieren mit dem reziproken Wert der Verdünnung, um die Koloniezahl/g zu ermitteln.

3.2.5 Untersuchung von L-Toxin- bzw. S-Toxin-Bildung in vitro

3.2.5.1 Anreicherung und Toxinnachweis aus Lebensmitteln

Um den Nachweis von ETEC aus Milch und Milchprodukten zu beschleunigen, wurde nach einem Untersuchungsgang gesucht, der die Isolierung der Keime zur Prüfung ihres Toxin-Bildungsvermögens überflüssig macht.

Hierzu wurden 3 Methoden auf ihre Anwendbarkeit geprüft:

1. Experimentell inokuliertes Camembert-CAYE-2-Bouillon-Homogenat:
Mit einem Referenzstamm (10^2 Keime/g) experimentell inokuliertes Untersuchungsmaterial (10 g) direkt in 20 ml CAYE-2-Bouillon homogenisieren und danach 20 h/37°C auf Rundschüttler (150 U/min) bebrüten.
2. Experimentell inokuliertes Camembert-Nutrient-broth-Homogenat:
Mit einem Referenzstamm (10^2 Keime/g) experimentell inokuliertes Untersuchungsmaterial (10 g) in 90 ml Nutrient-broth homogenisieren und für 4 h/37°C im Wasserbad bebrüten. Davon 1 ml in 12 ml CAYE-2-Bouillon auf Rundschüttler (150 U/min) inkubieren (18 - 24 h/37°C).
3. Experimentell inokuliertes Camembert-E.E.-broth-Homogenat:
Wie 2., jedoch unter Verwendung von Enterobacteriaceen-Anreicherungs-bouillon (E.E.-broth).

Bei allen drei Methoden wird nach einer Bebrütung und Zentrifugation der CAYE-2-Bouillon die evtl. vorhandene Rahmschicht vorsichtig entfernt (Spatel, Wasserstrahlpumpe). 10 ml des steril filtrierten Überstandes werden direkt für den GM₁-ELISA verwendet, 1 ml für den Baby-Maus-Test.

Die CAYE-2-Bouillon diene dabei nicht nur als Suspensionsmedium von festen Milchprodukten, sondern gleichzeitig als optimales Substrat zur Enterotoxinproduktion (70).

3.2.5.2 Experimentelle Inokulation und Bebrütung verschiedener Nährsubstrate

- Kontamination unveränderter Lebensmittelproben

- A. 20 ml Magermilch nach Zugabe eines Enterotoxin-bildenden Referenzstammes (10^5 - 10^8 Keime/ml) bis zu 3 Tage bei 20°C oder 24 h bei 37°C inkubieren.

Zentrifugieren und Toxine im fett- und keimfreien Überstand mittels ELISA und BMT nachweisen.

- B. 10 g aus festen Lebensmitteln wie Gouda, Camembert oder Hackfleisch unter sterilen Kautelen ein kleines Stück in der Mitte ausbohren.

0,1 ml Keimsuspension eines Referenzstammes (10^5 - 10^8 Keime/g) in die Vertiefung pipettieren und mit dem ausgebohrten Stück wieder verschließen.

3 Tage bei 20°C oder 24 h bei 37°C inkubieren.

Mit 20 ml physiologischer NaCl homogenisieren und zentrifugieren. Toxine im fett- und keimfreien Überstand mittels ELISA und BMT nachweisen.

- Kontamination homogenisierter Lebensmittelproben

Homogenisieren 10 g fester Lebensmittel mit 20 ml physiologischer NaCl. NaCl-Lebensmittel-Homogenat in einen 300 ml Erlenmeyerkolben füllen. 0,1 ml Keimsuspension eines Referenzstammes (10^5 - 10^8 Keime/ml) zugeben.

Auf Rundschüttler (150 U/min) 24 h/37°C inkubieren.

Zentrifugieren und Toxine im fett- und keimfreien Überstand mittels ELISA und BMT nachweisen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von ETEC L- und S-Toxinen

4.1.1 Beziehungen zwischen kulturellen/biochemischen Eigenschaften und dem Toxinbildungsvermögen von E.coli

Hämolysen und Toxinbildungsvermögen:

Von 20 Toxin-positiven Referenzstämmen waren sechs (30%) hämolysierend, dagegen von 9 Toxin-negativen Referenzstämmen einer (11%). Dieser Befund bestätigt, daß die Hämolysen keine hinreichend sicheren Hinweise auf die Produktion von Coli-Enterotoxinen liefert. Hämolysierende Stämme sollten jedoch besonders aufmerksam verfolgt werden, da der Anteil der Enterotoxinbildner bei diesen größer ist, als bei Gleichverteilung zu erwarten wäre. Das gilt insbesondere für Toxin-positive Stämme, die S- und L-Toxin gleichzeitig zu bilden vermögen, wie aus Tab. 5 hervorgeht.

Tab. 5: Häufigkeit hämolysierender Eigenschaften der Toxin-positiven Referenzstämmen			
	S-Toxin-Bildner n = 9	L-Toxin-Bildner n = 5	S-/L-Toxin-Bildner n = 6
Anz.d.Stämme			
nicht hämolysierend	9	4	1
hämolysierend	0	1	5

Biochemische Eigenschaften und Toxinbildungsvermögen:

Um eine möglichst große Anzahl biochemischer Parameter zu untersuchen, wurde für die vorliegenden Untersuchungen das Identifizierungssystem "API 50 Enterobacteriaceae (API 50 E)" eingesetzt. Dieses besteht aus 50 Mikroröhrchen, die ein dehydriertes Substrat für 38 Zuckervergärungs-Reaktionen und 11 biochemische Reaktionen anderer Art enthalten. Von den Reaktionen, die eine gute Wiederholbarkeit aufwiesen, sind in Tab. 6 neun Kriterien aufgeführt, deren prozentuale Verteilung Unterschiede zwischen Toxintypen einerseits und der Summe der Toxin-positiven Stämme und einer Vergleichsgruppe aus Toxin-negativen Stämmen andererseits erkennen läßt.

Tab. 6: Anteil (%) positiver Befunde ausgewählter biochemischer Parameter für Referenzstämme unter Berücksichtigung des Toxinbildungsvermögens

	LT-pos. Stämme n = 5	ST-pos. Stämme n = 9	LT/ST-pos. Stämme n = 6	TOX-pos. Stämme n = 20	TOX-neg. Stämme n = 9
d(-)Arabinose	60	33	0	33	33
Adonit	20	44	67	45	0
Dulcit	60	0	33	25	89
Amygdalin	0	0	17	5	0
Arbutin	0	22	0	10	0
Äskulin	20	33	33	30	0
Salizin	0	22	0	10	0
Saccharose	40	22	33	30	55
d(+)Raffinose	60	11	67	40	78

Toxin-negative Stämme sind überwiegend Adonit-negativ, Dulcit-positiv und Äskulin-negativ, während sich Toxin-positive Stämme davon in mindestens einem der drei Kriterien unterscheiden müßten. Da der Stichprobenumfang dieser Untersuchung relativ niedrig ist, können die Ergebnisse nur als Hinweis gewertet werden.

4.1.2 Serologische Identifizierung von L-Toxin-bildenden E.coli

Das verwendete Cholera-Antiserum zeigte sich gleichermaßen für den Nachweis von E.coli L-Toxin von Mensch, Rind und Schwein geeignet. Dieses ist speziell für die lebensmittelhygienische Diagnostik von Vorteil, da die Provenienz eines für den Menschen pathogenen Stammes unter diesem Aspekt erst von sekundärer Bedeutung ist und nur für epidemiologische Untersuchungen zur Differenzierung mehrerer in Frage kommender Kontaminationsquellen seine Herkunft von einer bestimmten Wirtsspezies interessiert.

4.1.2.1 MANCINI- und ELEK-Test

Dem Prinzip nach gehört der ELEK-Test zu den Agargeldiffusionstests, zu denen auch der Ouchterlony- und der MANCINI-Test zählen. Diese Tests haben im Vergleich zu anderen serologischen Methoden wie ELISA und RIA eine relativ geringe Empfindlichkeit, können aber im Rahmen von Einzeluntersuchungen mit verhältnismäßig geringem Aufwand durchgeführt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Aktivität des Cholera-Antiseraums in der radialen Immundiffusion nach MANCINI et al. (1965) geprüft. Bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:200 im Agargel ergab sich eine Nachweisgrenze von 3,6 µg/ml. Der Test zeigt somit annähernd zwei Zehnerpotenzen weniger empfindlich an als der GM₁-ELISA, der aus unverdünntem E.coli-Überstand Toxinkonzentrationen von 10 - 80 ng/ml nachzuweisen erlaubte.

Auch bei Einengung des Ausgangsvolumens, z.B. durch Vakuumdialyse, auf 10% kann im MANCINI-Test die Bildung von E.coli L-Toxin nicht hinreichend empfindlich nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen wurde eine Reinigung des Serums durch Kopplung der IgG-Fraktion an eine Protein A-Säule (Firma Pharmacia) und anschließende Elution mit einem Glycin-HCl-Puffer (0,1 M, pH 3,0) angestrebt. Wie sich im MANCINI-Test herausstellte, war dieses gereinigte Serum nicht wesentlich aktiver als das native Cholera-Antiserum.

Auch im ELEK-Test war mit diesem gereinigten Serum kein positives Ergebnis zu erzielen. Zahlreiche Modifikationen des Tests (Erhöhen und Erniedrigen der Konzentration, Weglassen des mit Polymyxin B getränkten Filterpapiers, verschiedene Lincomycinkonzentrationen im Agar, Verlängern und Verkürzen der Inkubationszeiten, Erhöhen und Erniedrigen der Antiserumkonzentration) führten zu keiner Änderung dieses negativen Ergebnisses für die erwiesenermaßen L-Toxin-positiven Referenzstämme. Hierfür kann eine noch nicht ausreichende Reinigung des Serums oder eine zu geringe Toxinbildung der E.coli-Stämme auf festem Medium verantwortlich sein.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die beiden methodischen Ansätze "MANCINI- und ELEK-Test" nicht weiter verfolgt.

4.1.2.2 Staphylokokken-Coagglutination

Im Vergleich zu anderen serologischen Methoden ist die Staphylokokken-Coagglutination schnell und einfach auszuführen. Ein weiterer Vorzug ist, daß weder aufwendige Apparaturen noch teure Reagenzien benötigt werden.

Als Indikatorpartikel für die Coagglutination werden Zellen eines an Protein A reichen S.aureus-Stammes benötigt. Hierzu dient meist, wie auch für die vorliegende Untersuchung, der Stamm COWAN-I. Nach der Bebrütung in TSB für 24 h/37° C ist darauf zu achten, daß die Zellen mindestens 3 mal in PBS (0,1 M; pH 8,5) gewaschen werden. Die sorgfältige

Durchführung dieses Waschvorgangs ist auch nach eigenen Erfahrungen für die Sicherung einer ausreichenden Empfindlichkeit unverzichtbar. Ein gelegentlich im Sediment auftretender schwarzer Niederschlag sollte vor der weiteren Verarbeitung verworfen werden.

Um eine dauerhafte Kopplung von Antikörper und Protein A zu garantieren, muß der pH-Wert von 8,5 strikt eingehalten werden.

Die kurzzeitige Behandlung (ca. 10 sec.) der Zellen mit Ultraschall vor dem Konjugieren mit Antikörpern führt zu einer etwas längeren Lagerungsfähigkeit der Suspension, die sonst zu gummiartigem Verkleben der Zellen neigt. Andererseits wird durch die damit verbundene feinere Granulierung das Ablesen der Agglutination erschwert. Deshalb wurde auf die Ultraschallbehandlung verzichtet und eine geringere Stabilität der Suspension in Kauf genommen.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Objektträgeragglutination bevorzugt.

Die Empfindlichkeit dieser Tests reichte aus, um alle 11 L-Toxin bildenden Referenzstämme aus unverdünntem Überstand nachzuweisen.

Fragliche Reaktion, die bei allen Agglutinations-Tests, ob im Röhrchen oder auf dem Objektträger, infolge unspezifischer Bindungen auftreten, lassen sich nach einer längeren Inkubation (z.B. 1 h) in einer feuchten Kammer besser beurteilen als im Kapillarröhrchen. In noch verbleibenden Zweifelsfällen muß der ELISA zur Abklärung herangezogen werden.

Es ist zu berücksichtigen, daß Toxin-bildende E.coli-Stämme bei der Bebrütung in CAYE-2-Bouillon unterschiedliche Toxinmengen produzieren. Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Agglutination sind in gewissen Grenzen von der Toxinmenge abhängig und erlauben somit eine semiquantitative Beurteilung der Agglutinationsreaktion (Einteilung von + bis +++). Sehr schwache Toxinbildner können zu falschnegativen Ergebnissen führen.

Um das zeitraubende Bebrüten der E.coli-Stämme in CAYE-2-Bouillon und das Herstellen von bakterienfreiem Überstand zu umgehen, war es naheliegend, die Kolonien direkt in sensibilisierter Staphylokokken-Suspension zu verreiben. Dieses Vorgehen beruhte auf der Annahme, daß Toxin-bildende E.coli-Stämme auch auf festem Medium Toxine produzieren und diese zumindest partiell noch an der Zellwand haften. Trotz verschiedener Modifikationen war das Ergebnis, meist durch Schlierenbildung verursacht, nicht abzulesen.

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Staphylokokken-Coagglutination wurde für eine Verdünnungsreihe anstelle des nicht verfügbaren E.coli L-Toxin gereinigtes Choleratoxin verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 wiedergegeben.

Tab. 7: Ermittlung der Nachweisgrenze für Choleratoxin mit Hilfe der Staphylokokken-Coagglutination			
Choleratoxin in ng/ml			
10.000	5.000	2.500	1.250
++	++	+++	+++
625	312	156	78
+++	+++	++	++
39	20	10	5
+	+	+	-

Die Nachweisgrenze für Choleratoxin mit der Staphylokokken-Coagglutination liegt bei 10 ng/ml Toxin. Diese für eine Coagglutination hohe Empfindlichkeit ist nur bei Verwendung eines Antiserums mit sehr hohem Antikörpertiter erreichbar. Das selbst hergestellte Cholera-Antiserum hatte im GM₁-ELISA einen Antikörpertiter von über 1:200.000. Der CAYE-2-Bouillon-Überstand nach Anzüchtung der Toxin-positiven Referenzstämme unter Optimalbedingungen zeigte mit diesem Antiserum in der Staphylokokken-Coagglutination die in Tab. 8 zusammengefaßten Ergebnisse. Die Bewertung der Staphylokokken-Coagglutination sind den im GM₁-ELISA ermittelten Toxinkonzentrationen gegenübergestellt.

Tab. 8: Beurteilung der Toxin-positiven Referenzstämme mit Hilfe der Staphylokokken-Coagulination

Stamm	Bewertung	Cholera-äquivalente Toxinkonzentration (in ng/ml) (im ELISA bestimmt)
O8 K100	++	45,1
O8 K83 H21	+	16,7
O8 K201 H4	++	34,7
O8 K88	++	43,5
O20 K88	+++	63,5
O9 K204 K88	+	20,4
O149 K91 K88	++	29,3
O8 K87 K88	++	51,2
O149 K91	+	17,4
O138 K81 K88	+	18,2
O78 K80 H11	+	22,4

Keiner der Toxin-negativen Referenzstämme wurde positiv beurteilt.

4.1.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Der in den vorliegenden Untersuchungen durchgeführte GM₁-ELISA basiert auf der spezifischen Bindung des E.coli L-Toxins an GM₁-Gangliosid. Durch das Beschichten der Polystyrolperlen mit dem Gangliosid erübrigt sich ein zweiter Antikörper, wie er für die YOLKEN-Methode erforderlich ist (115). Die hohe Empfindlichkeit und Spezifität des Tests sind zum großen Teil auf dieses Gangliosid-Coating zurückzuführen: Gerade für den Bereich der Lebensmittelhygiene ist wegen der saprophytären Begleitflora eine hohe Spezifität von großem Vorteil, weil ohne langwierige Keimisolierung direkt auf vorhandene Toxine geprüft werden kann. Zumindest für die Untersuchung von Milch und Milchprodukten ist die Verwendung von Polystyrolperlen anstatt Mikrotitertabletts zweckmäßig, weil die mit Gangliosiden beschichteten Perlen ohne aufwendige Reinigung (vor allem von Fetten) direkt mit den zu untersuchenden Milcherzeugnissen inkubiert werden können.

Die für diese Arbeit vorgenommenen Modifikationen des GM₁-ELISA gegenüber der ersten Beschreibung von SVENNERHOLM und HOLMGREN (1978)

beschränken sich auf die Verwendung von Polystyrolperlen sowie auf abgeänderte Pufferzusammensetzung und Inkubationszeiten.

Anhand dieses GM₁-ELISA war es möglich, alle L-Toxin bildenden Referenzstämme einwandfrei zu identifizieren und als Kontrolle Cholera-Toxin (s.Kap. 2.2.3.1) in Konzentrationen von mindestens 1 ng/ml zweifelsfrei nachzuweisen. Für eine Verdünnungsreihe von Choleratoxin ergaben sich folgende Extinktionswerte im ELISA (s.Tab. 9):

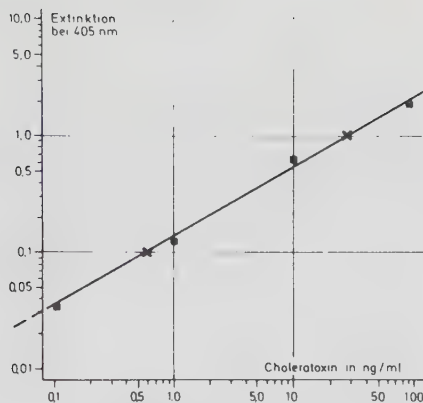
Tab. 9: Standardreihe für Choleratoxin in ng/ml mit Hilfe des ELISA (Angabe in Extinktionswerten)					
Choleratoxin in ng/ml	100	10	1	0,1	Kontrolle PBS 0,1 M pH 7,0
	1,851	0,632	0,138	0,035	0,028
	1,770	0,579	0,124	0,039	0,025
	1,867	0,638	0,129	0,032	0,024
$\bar{x}_A$	1,829	0,616	0,130	0,035	0,026
s	0,052	0,032	0,007	0,004	0,002
VK	2,8	5,2	5,4	11,4	7,7

Nach Erstellung dieser Standardreihe für Choleratoxin (100 ng; 10 ng; 1 ng; 0,1 ng/ml) ergibt sich nach Mittelung der Extinktionswerte und Übertragung auf doppelt logarithmiertem Papier der Mittelwerte annähernd eine Gerade.

Für die gemittelten Extinktionswerte (y-Achse) und die Toxinkonzentrationen (x-Achse) ließ sich die Regressionsgleichung

$$\lg \text{Toxinkonz.} = 1,478 + 1,708 \lg \text{Extinktion}$$

bestimmen.



Graphische Darstellung der Regressionsgleichung (x—x) für eine Verdünnungsreihe von Cholera toxin (ng/ml)
(•) = Meßpunkte

IV 9/82

Abb. 6

Um den GM₁-ELISA für unbekannte E.coli-Stämme nicht nur qualitativ (Enterotoxinbildner: ja - nein), sondern auch quantitativ auswerten zu können, kann man - unter Vernachlässigung dessen, daß E.coli L-Toxin und Cholera toxin zwar sehr ähnlich, aber nicht absolut identisch sind - die erhaltenen Extinktionswerte in Toxinmenge pro ml umrechnen.

Extinktionswerte über 0,200, bei 405 nm gemessen, wurden als positives Ergebnis gewertet. Diese Grenze liegt, wie aus Abb. 7 hervorgeht, in einem Bereich, der von den doppelten Standardabweichungen der Toxin-positiven und -negativen Werte nicht erreicht wird. Somit bietet sie die Gewähr, weder Werte von Toxinbildnern an der unteren Streugrenze noch Werte von Toxin-negativen Stämmen an der oberen Streugrenze falsch einzuordnen. Die Extinktionswerte der Referenzstämmen sind in Tab. 10 aufgeführt.

Rechnerisch lassen sich die Toxinkonzentrationen durch Einsetzen der Extinktionswerte in die Regressionsgleichung ($\lg \text{Toxinkonz.} = 1,478 + 1,708 \lg \text{Extinktion}$) ermitteln.

Für die Enterotoxin-positiven Referenzstämme, bebrütet in CAYE-2-Bouillon ergeben sich dabei Toxinkonzentrationen im Überstand zwischen 16,7 und 63,5 ng/ml (s. Tab.10 und Abb.7).

Tab. 10: Extinktionswerte der Referenzstämme im GM₁-ELISA und berechnete Enterotoxinkonzentrationen für die Toxin-bildenden Stämme

Toxin-negative Referenzstämme			Toxin-positive Referenzstämme			
Stamm	Extinktion $\bar{x}_A \pm s$ (aus 3 Messungen)	V_K	Stamm	Extinktion $\bar{x}_A \pm s$ (aus 3 Messungen)	V_K	Enterotoxin Konz. in ng/ml
020 K	0,034 $\pm$ 0,008	24,7	08 K 100	1,268 $\pm$ 0,024	1,9	45,1
045 K-	0,022 $\pm$ 0,002	9,1	08 K 83 H 21	0,710 $\pm$ 0,027	3,8	16,7
064 K-	0,066 $\pm$ 0,006	8,3	08 K 201 H 4	1,087 $\pm$ 0,066	6,1	34,7
078 K 80	0,044 $\pm$ 0,003	6,0	08 K 88	1,242 $\pm$ 0,046	3,7	43,5
088 K-	0,043 $\pm$ 0,005	12,3	020 K 88	1,550 $\pm$ 0,040	2,6	63,5
0103 K-	0,051 $\pm$ 0,004	7,9	09 K 204 K 88	0,796 $\pm$ 0,017	2,1	20,4
0112 K 68	0,023 $\pm$ 0,004	17,4	0149 K 91 K 88	0,985 $\pm$ 0,012	1,2	29,3
0126 K 71	0,043 $\pm$ 0,003	6,7	08 K 87 K 88	1,366 $\pm$ 0,049	3,6	51,2
0152 K-	0,036 $\pm$ 0,001	2,8	0149 K 91	0,725 $\pm$ 0,019	2,6	17,4
			0138 K 81 K 88	0,745 $\pm$ 0,033	4,5	18,2
			078 K 80 H 11	0,842 $\pm$ 0,009	1,0	22,4
Total $\bar{x}_G \pm s_G$	0,038 $\pm$ 1,43	10,6		0,992 $\pm$ 1,32	3,0	

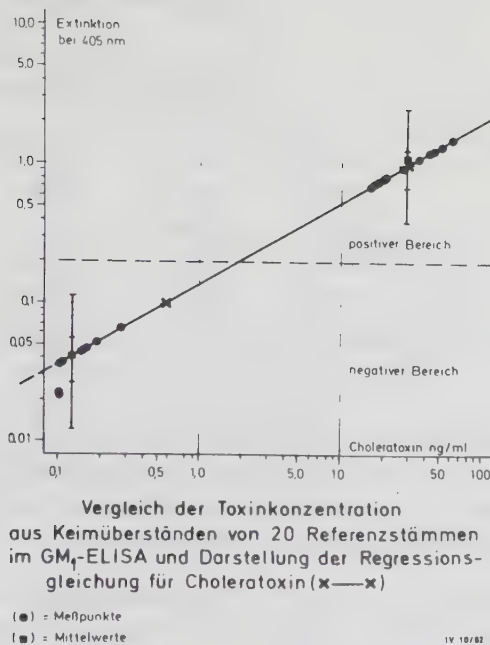


Abb. 7

Die gemittelten Variationskoeffizienten mit 3,0% für die Toxinbildner und 10,6% für die Toxin-negativen Referenzstämmen zeigen die durchschnittlich geringe Streubreite der Werte aus drei Messungen je Referenzstamm an.

Die diagnostische Sicherheit wird auch in einem Langzeitversuch deutlich: 4 Referenzstämmen (2 Toxin-positive und 2 Toxin-negative Stämme) wurden im Laufe eines Jahres 5 mal auf L-Toxinbildung untersucht. Hierzu wurde die CAYE-2-Bouillon mit unterschiedlich alten Kolonien von Blutplatten (bis zu 4 Wochen alt), die z.T. gekühlt (2° - 5° C) oder bei Zimmertemperatur gelagert worden waren, beimpft. Tab. 11 faßt die Ergebnisse zusammen:

Tab. 11: Wiederholbarkeit der GM₁-ELISA-Ergebnisse

5 Wiederholungen mit jeweils 3 Messungen	E. coli - Stämme			
	0103 K-	0152 K-	09 K204 K88	078 K80 H21
1.	0,054	0,027	0,796	0,802
2.	0,067	0,039	0,663	0,784
3.	0,057	0,026	0,746	0,866
4.	0,051	0,036	0,751	0,842
5.	0,063	0,031	0,778	0,747
	0,058 $\pm$ 0,07	0,032 $\pm$ 0,006	0,747 $\pm$ 0,051	0,808 $\pm$ 0,047
	V _K = 11,3	V _K = 17,6	V _K = 6,8	V _K = 5,8

Die errechneten Variationskoeffizienten der 5 Wiederholungen mit V_Kmax von 17,6% und V_Kmin von 5,8% mit korrespondierenden $\bar{x}_A$ -Werten von 0,032 bzw. 0,808 sprechen für die gute Wiederholbarkeit des GM₁-ELISA auch nach langer Aufbewahrungszeit der ETEC-Stämme.

Um zu überprüfen, ob auch andere Enterotoxinbildner zu einem positiven Ergebnis im GM₁-ELISA führen können, wurden je ein Stamm von Yersinia enterocolitica, Klebsiella pneumoniae, Vibrio parahaemolyticus und Bacillus cereus in CAYE-2-Bouillon angeimpft und der Überstand nach 18 - 24 h/37° C Bebrütung getestet. Außerdem wurde Staphylokokken-Enterotoxin B in einer Konzentration von 100 ng/ml im ELISA geprüft. Mit keinem dieser Enterotoxine war ein positives Ergebnis zu erreichen.

4.1.3 Nachweis von S-Toxin-bildenden E.coli mit dem Baby-Maus-Test

Von den 15 S-Toxin-bildenden Referenzstämmen konnte nur bei 12 Stämmen ein positiver S-Toxinnachweis geführt werden - möglicherweise durch Verlust des determinierenden Plasmids.

Als Maß für die vermehrt im Darm befindliche Flüssigkeitsmenge und damit der Toxizität eines Stammes wird ein aus Darmgewicht zu Restkörpergewicht der Babymaus ermittelter Faktor, der in den Tab. 12 und 13 für die Referenzstämmen wiedergegeben ist, bestimmt. Dieser Faktor ist aus 3 einwandfrei intragastral injizierten Mäusen durch Mittelung berechnet worden.

Tab. 12: Wirkung des Kulturüberstandes der Toxin-negativen Referenzstämme im BMT

Stamm-Nr.	Darm	Restkörper- gewicht	Faktor	$\bar{x}_A \pm s$	V_K
O45 K-	0,12	2,06	0,058	$0,062 \pm 0,006$	9,5
	0,12	2,00	0,060		
	0,13	1,88	0,069		
O112 K68	0,12	2,04	0,059	$0,060 \pm 0,001$	1,7
	0,17	2,84	0,060		
	0,15	2,46	0,061		
O126 K71	0,16	2,25	0,071	$0,068 \pm 0,003$	3,7
	0,12	1,81	0,066		
	0,10	1,48	0,068		
O20 K	0,19	2,75	0,069	$0,066 \pm 0,004$	5,7
	0,18	2,64	0,068		
	0,16	2,57	0,062		
O64 K-	0,18	2,97	0,061	$0,059 \pm 0,002$	3,5
	0,15	2,63	0,057		
	0,16	2,68	0,060		
O78 K80	0,16	2,34	0,068	$0,064 \pm 0,005$	8,3
	0,16	2,78	0,058		
	0,18	2,71	0,066		
O88 K-	0,10	1,96	0,051	$0,057 \pm 0,006$	9,8
	0,10	1,71	0,058		
	0,09	1,45	0,062		
O103 K-	0,18	2,44	0,074	$0,075 \pm 0,002$	2,2
	0,17	2,31	0,074		
	0,18	2,35	0,077		
O152 K-	0,14	1,96	0,071	$0,069 \pm 0,005$	6,8
	0,16	2,50	0,064		
	0,19	2,62	0,072		
				$0,064 \pm 0,006$	5,7

Tab. 13: Wirkung des Kulturüberstandes der Toxin-positiven Referenzstämme im BMT

Stamm-Nr.	Darm	Restkörper- gewicht	Faktor	$\bar{x}_A \pm s$	V_K
O101 K30 K99	0,22	1,41	0,156	0,136 $\pm$ 0,019	13,8
	0,22	1,84	0,119		
	0,24	1,82	0,132		
O101 K28 K99	0,22	1,46	0,151	0,137 $\pm$ 0,013	9,1
	0,17	1,30	0,131		
	0,19	1,48	0,128		
O9 K(A) K99	0,28	2,06	0,136	0,120 $\pm$ 0,015	12,1
	0,26	2,40	0,108		
	0,28	2,44	0,115		
O20 K? K 99	0,19	1,20	0,158	0,131 $\pm$ 0,024	18,3
	0,17	1,40	0,121		
	0,17	1,51	0,113		
O9 K85 K99	0,10	1,12	0,089	0,090 $\pm$ 0,007	7,3
	0,20	2,39	0,084		
	0,28	2,89	0,097		
O9 K204 K88	0,17	1,24	0,137	0,134 $\pm$ 0,017	12,9
	0,29	1,94	0,149		
	0,22	1,92	0,115		
O149 K91 K88	0,19	2,22	0,090	0,106 $\pm$ 0,015	14,0
	0,28	2,35	0,119		
	0,23	2,10	0,110		
O149 K91	0,24	1,93	0,120	0,106 $\pm$ 0,013	11,8
	0,21	2,10	0,100		
	0,22	2,28	0,097		
O9 K(A) 103	0,20	1,86	0,108	0,118 $\pm$ 0,010	8,1
	0,21	1,78	0,118		
	0,21	1,65	0,127		
Ox46 K(A) 103	0,28	1,96	0,143	0,119 $\pm$ 0,021	17,7
	0,22	2,08	0,106		
	0,23	2,15	0,107		
O101 K(A) 30	0,29	2,09	0,139	0,123 $\pm$ 0,014	11,4
	0,24	2,12	0,113		
	0,29	2,47	0,117		
O7 K-	0,16	1,67	0,096	0,099 $\pm$ 0,006	5,8
	0,19	1,79	0,106		
	0,21	2,19	0,096		
				0,118 $\pm$ 0,015	11,9

Für die untersuchten S-Toxin-positiven Referenzstämme ergaben sich im BMT Faktoren (Darm/Restkörper-Quotienten) zwischen 0,084 und 0,156 ($\bar{x}_A=0,118$). Die Toxin-negativen Stämme wiesen eine Schwankungsbreite der ermittelten Faktoren von 0,058 bis 0,077 ($\bar{x}_A = 0,064$) auf. Die Präzision der Methode zeigt sich in den für Tierversuche sehr guten Mittelwerten der Variationskoeffizienten von 11,9% für die Toxinbildner und 5,7% für die Kontrollgruppe.

Durch die Gegenüberstellung des niedrigsten Faktors der Toxin-positiven (im vorliegenden Material 0,084) und des höchsten Faktors der Toxin-negativen Stämme (im vorliegenden Material 0,077) läßt sich eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Methode treffen. Da diese Werte sich nicht überschneiden, ermöglichen sie dem Untersucher eine exakte Zuordnung aller Stämme. Der in der Literatur angegebene Grenzwert von 0,083 wird als geeignet bestätigt.

Der Variationskoeffizient der arithmetischen Mittelwerte von 2 Referenzstämmen (ein Toxin-positiver und ein Toxin-negativer Stamm) mit jeweils 5 unabhängigen Wiederholungen betrug 7,4% bzw. 7,6% (s.Tab.14).

Tab. 14: Zur Wiederholbarkeit der BMT-Ergebnisse (Faktoren ermittelt aus mindestens 3 Babymäusen)		
Wiederholungen	Faktoren von 2 E.coli-Stämmen im BMT	
	O101 K30 K99	O152 K-
1	0,156	0,064
2	0,138	0,060
3	0,129	0,071
4	0,136	0,069
5	0,147	0,072
	$0,141 \pm 0,010$	$0,067 \pm 0,005$
	$V_K = 7,4$	$V_K = 7,6$

Die Verlässlichkeit und gute Wiederholbarkeit des BMT wird mit diesen Werten eindeutig belegt.

4.2 Prüfung von ELISA und BMT an aus Lebensmitteln isolierten Feldstämmen

Insgesamt wurden 157 E.coli-Stämme aus Lebensmittelproben tierischen Ursprungs, vorwiegend Milch und Milchprodukten, untersucht. Von diesen waren 5 ETEC. 3 Stämme bildeten ausschließlich L-Toxin, ein weiterer allein S-Toxin und ein Stamm gleichzeitig L- und S-Toxin. Über deren Herkunft informiert Tab. 15. Die beiden zugesandten Enterotoxinbildner waren aus Camembert bzw. Joghurt isoliert worden, wobei der Nachweis aus Joghurt als seltener Befund gewertet werden muß.

Tab. 15: Enterotoxinbildungsvermögen der aus Lebensmitteln isolierten E.coli-Stämme

Anzahl isolierter Stämme (Anz.zugesandter Stämme in Klammern)	Lebensmittelart	Anzahl der		
		S-Toxin bildenden Stämme	L-Toxin bildenden Stämme	L-/S-Toxin bildenden Stämme
77 (25)	Camembert	1	2	1 (1)
48 (48)	Milch	-	-	-
4 (4)	Joghurt	-	1 (1)	-
3 (3)	Sahne	-	-	-
7 (7)	Milchpulver	-	-	-
2 (2)	Hartkäse	-	-	-
4 (4)	Rinderhackfleisch	-	-	-
9 (9)	Schweinehackfleisch	-	-	-
3 (3)	Flüssigei	-	-	-
Ges.: 157 (105)				

Die Extinktionswerte der L-Toxin-bildenden Stämme im GM₁-ELISA nach Bebrütung in CAYE-2-Bouillon lagen zwischen 0,396 und 0,653. Diese Werte würden einer Cholera-Toxin-Konzentration von ca. 6 - 15 ng Toxin/ml entsprechen.

Die S-Toxin-Bildner ergaben im Baby-Maus-Test gemittelte Darm/Restkörper-Quotienten von 0,106 und 0,130.

Die Identifizierung der ETEC-Stämme war labortechnisch ohne Schwierigkeiten möglich, dürfte jedoch bei Reihenuntersuchungen mit einer Vielzahl zu untersuchender Einzelstämme zu viel Zeit und Aufwand erfordern. Der folgende Vorschlag soll deshalb ohne aufwendige Isolierungsmaßnahmen auch aus einer Enterobacteriaceen-Mischpopulation die Feststellung möglich machen ob in ihr ETEC vorhanden sind oder nicht.

4.3 Vorschlag für einen Untersuchungsgang zum Nachweis von ETEC

Um einen geeigneten Untersuchungsgang für Milch und Milchprodukte zu entwickeln, schien zunächst der Einfachheit halber das Homogenisieren des Lebensmittels in CAYE-2-Bouillon naheliegend. Die CAYE-2-Bouillon könnte dabei nicht nur als Suspensionsmedium von festen Milchprodukten, sondern gleichzeitig als optimales Substrat zur Enterotoxinproduktion dienen. Außerdem ist sie durch ihren relativ hohen Gehalt an Lincomycin (20 µg/ml) zur Hemmung des Wachstums grampositiver Keime geeignet. Nach der Inkubation, der Zentrifugation (3000 g/15 Minuten) und Filtration (0,45 µm), kann der bakterienfreie Überstand für den GM₁-ELISA und den Baby-Maus-Test verwendet werden. Die Verfolgung dieses diagnostischen Prinzips hat jedoch wie Tab. 16 exemplarisch ausweist, zu unbefriedigenden Ergebnissen geführt.

Tab. 16: Keimzahlen und Toxinbildung nach Bebrütung (24 h/37° C) von ETEC in Camembert-CAYE-2-Bouillon-Homogenat

Stamm	Enterotoxin	Keimzahl/ml	Prüfung der Toxinbildung	
			BMT	ELISA
O149 K91 K88	L-/S-Toxin	1,5x10 ⁸	positiv	negativ
O149 K91	L-/S-Toxin	3,6x10 ⁸	negativ	positiv
O138 K81 K88	L-Toxin	3,2x10 ⁷	-	positiv
O8 K87 K88	L-Toxin	1,3x10 ⁸	-	negativ
O101 K30 K99	S-Toxin	6,0x10 ⁸	positiv	-
O101 K28 K99	S-Toxin	4,3x10 ⁸	negativ	-

Nach experimenteller Inokulation von Camembert mit ETEC und Inkubation der Keime im Lebensmittel CAYE-2-Bouillon-Homogenat bis zu 3 Tage/20°C konnte nur ein Teil der Referenz-ETEC als Toxinbildner identifiziert werden. Der Grund hierfür liegt offenbar im hohen Anteil der Milchbestandteile, der zwar für die Vermehrung der Keime vorteilhaft ist, sich auf die Toxinbildung aber nachteilig auswirkt.

Eine sich aus dieser Interpretation ergebende Modifikation verfolgt das Ziel, die Hemmung der Toxinbildung durch Milchbestandteile auszuschalten. Dieses ist in folgender Weise zu erreichen versucht worden: Nach Homogenisieren von 10 g Probenmaterial in 90 ml Nutrient-broth folgt eine Inkubation (4 h/37°C) im Wasserbad und Überimpfen von 1 ml in 12 ml CAYE-2-Bouillon. Der Überstand wurde nach einer Inkubation von 20 h/37° C gewonnen. Aber

auch mit diesem Prinzip konnten nicht alle Referenzstämme einwandfrei diagnostiziert werden, wie beispielhaft in Tab. 17 dargestellt ist.

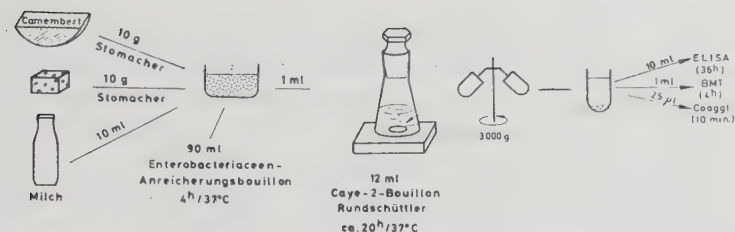
Tab. 17: Keimzahlen und Toxinbildung nach einem Untersuchungsgang mit Voranreicherungsphase in Nährbouillon zur Identifizierung von ETEC aus Lebensmitteln					
Stamm	Enterotoxin	Keimzahl/ml	Prüfung der Toxinbildung		
			BMT	ELISA	
O149 K91 K88	L-/S-Toxin	$1,3 \times 10^8$	positiv	negativ	
O138 K81 K88	L-Toxin	$7,8 \times 10^7$	-	positiv	
O20 K88	L-Toxin	$2,0 \times 10^7$	-	positiv	
O101 K30 K99	S-Toxin	$3,4 \times 10^8$	negativ	-	
O20 K99	S-Toxin	$1,8 \times 10^8$	positiv	-	

Vermutlich läßt sich die Hemmung der Toxinproduktion bei einigen Stämmen auf die übermäßige Vermehrung der Begleitflora während der Voranreicherung zurückführen. Diese Einschränkung muß sich ausschalten lassen, wenn schon während der Anreicherungsphase eine Selektion der gramnegativen Flora erreicht wird.

Mit dem nachstehend detailliert beschriebenen Untersuchungsprinzip ließen sich alle ETEC aus Camembert-Käse eindeutig als Toxinbildner identifizieren, wie in Tab. 18 an Beispielen typischer Referenzstämme belegt wird.

Tab. 18: Reisolierung und Nachweis des Toxinbildungsvermögens von ETEC aus Camembert-Käse über Anreicherung in E.E.-broth und CAYE-2-Bouillon					
Stamm	Enterotoxin	Keimzahl/ml	Prüfung der Toxinbildung		
			BMT	ELISA	
O149 K91 K88	L-/S-Toxin	$4,6 \times 10^7$	positiv	positiv	
O9 K204 K88	L-/S-Toxin	$1,2 \times 10^7$	positiv	positiv	
O101 K30 K99	S-Toxin	$9,5 \times 10^7$	positiv	-	
O20 K99	S-Toxin	$3,4 \times 10^7$	positiv	-	
O8 K201 H4	L-Toxin	$8,1 \times 10^7$	-	positiv	
O20 K88	L-Toxin	$2,5 \times 10^8$	-	positiv	

Der Untersuchungsgang ist in Abb. 8 veranschaulicht.



Schematischer Untersuchungsgang zur Isolierung und Identifizierung Enterotoxin-bildender E.coli-Stämme aus Lebensmitteln

IV 20 / 82

Abb. 8

Die einzelnen Untersuchungsschritte sind folgende:

1. Nach Homogenisieren des Lebensmittels, Anreicherung der gramnegativen Flora in E.E.-broth (4 h/37°C)
2. Anregung der Enterotoxinbildung in CAYE-2-Bouillon (20 h/37°C)
3. Herstellen eines keim- und fettfreien Überstandes
4. Nachweisen von L-Toxin im ELISA oder der Staphylokokken-Coagglutination bzw. von S-Toxin im BMT

Der Vorteil der beschriebenen Methode zur Identifizierung von ETEC-Enterotoxinen direkt aus dem Überstand der CAYE-2-Bouillon mit Hilfe von ELISA bzw. Staphylokokken-Coagglutination für L-Toxine und dem BMT für S-Toxine liegt darin, daß keine Einzelisolierungen erforderlich sind, bei denen Stämme übersehen werden können. Vielmehr reicht die Empfindlichkeit der eingesetzten Methoden aus, um die Toxine aus dem CAYE-2-Bouillon-Überstand der gesamten Enterobacteriaceen-Population nachzuweisen. Praktisch diagnostisch ist zudem von Interesse, daß die Untersuchung bis zur Durchführung des L- bzw. S-Toxinnachweises nur 24 Stunden beansprucht, während für die Isolierung von Einzelstämmen ca. 46 Stunden erforderlich sind.

4.4 Zur Frage der Präformation von ETEC L- und S-Toxinen in Lebensmitteln

Ob gute Wachstumsbedingungen für Toxinbildner in Lebensmitteln gleichzeitig eine Toxinbildung in diesen ermöglichen, ist noch nicht mit hinreichender Sicherheit geklärt.

Als Beitrag zur Klärung dieser Frage wurden ETEC in CAYE-2-Bouillon, Magermilch, Camembert- und Gouda-Käse, Camembert- bzw. Hackfleisch-Homogenaten homogenisiert und aus den Überständen der Nachweis von L- und S-Toxinen zu erbringen versucht.

In CAYE-2-Bouillon wurde eine Endkeimzahl von 10^7 /ml erreicht. Im Überstand konnten die Stamm-korrespondierenden Toxine eindeutig nachgewiesen werden, und zwar in einer Konzentration von 10 - 80 ng/ml L-Toxin und einer eindeutig positiven Reaktion im BMT. In Magermilch lag die Endkeimzahl bei 10^8 - 10^{10} /ml; der Toxinnachweis verlief für alle 20 Referenzstämme negativ. Tab. 19 zeigt die Ergebnisse für je einen Repräsentanten der L-, S- und L/S-Toxinbildung.

Tab 19: Keimzahlen und Toxinbildung nach Bebrütung (24 h/37°C) von ETEC in Magermilch				
Stamm	Enterotoxin	Keimzahl in Magermilch	Prüfung der Toxinbildung	
			BMT	ELISA
O149 K91 K88	L-/S-Toxin	$3,5 \times 10^9$	negativ	negativ
O101 K30 K99	S-Toxin	$6,2 \times 10^8$	negativ	-
O138 K81 K88	L-Toxin	$1,8 \times 10^{10}$	-	negativ

In analogen Untersuchungen wurden in experimentell mit ETEC kontaminierten Camembert- und Gouda-Käse sowie Hackfleisch ebenfalls keine Enterotoxine nachgewiesen. Tab. 20 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tab. 20: Keimzahlen und Toxinbildung nach Bebrütung (24 h/37° C) von ETEC in Hackfleisch, Gouda und Camembert

Lebensmittel	Stamm	Enterotoxin	Keimzahl/ml	Prüfung der Toxinbildung	
				BMT	ELISA
Hackfleisch	O101 K30 K99	S-Toxin	$4,0 \times 10^9$	negativ	-
	O138 K81 K88	L-Toxin	$3,1 \times 10^9$	-	negativ
Gouda	O101 K30 K99	S-Toxin	$2,8 \times 10^7$	negativ	-
	O138 K81 K88	L-Toxin	$4,3 \times 10^7$	-	negativ
Camembert	O101 K30 K99	S-Toxin	$1,9 \times 10^9$	negativ	-
	O138 K81 K88	L-Toxin	$3,5 \times 10^8$	-	negativ

Somit wirken sich Lebensmittel offenbar hemmend auf die Toxinproduktion von ETEC aus.

Wurde jedoch Camembert-Käse in phys. NaCl homogenisiert, und nach der Kontamination mit ETEC-Referenzstämmen 24 h/37°C auf einem Rundschtüttler inkubiert, so waren 4 von 10 Stämmen in der Lage, das korrespondierende L-Toxin zu bilden. Die Toxinmenge war jedoch geringer als in der parallel angesetzten CAYE-2-Bouillon. Entsprechenderweise waren 3 von 4 Referenzstämmen in der Lage, das zugehörige S-Toxin zu bilden.

Tab. 21 zeigt die Ergebnisse für jeweils einen S- und L-Toxinbildner.

Tab. 21: Keimzahlen und Toxinbildung nach Bebrütung (24 h/37°C) von ETEC in NaCl-Camembert-Homogenat und parallel in Caye-2-Bouillon

Stamm	Enterotoxin	Keimzahl in CAYE-2-Bouillon	Faktor im BMT	Keimzahl in NaCl-Camembert	Faktor im BMT
O101 K28 K99	S-Toxin	$2,7 \times 10^6$	0,142	$1,9 \times 10^9$	0,140
			Extinktion im ELISA		Extinktion im ELISA
O138 K81 K88	L-Toxin	$1,1 \times 10^7$	1,520	$3,5 \times 10^9$	0,450

Mit Hackfleisch-Homogenat, auf einem Rundschtüttler inkubiert (24 h/37°C), wurden gleiche Ergebnisse erzielt.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse an, daß ETEC in Lebensmitteln nur unter extremen Bedingungen Toxine bilden.

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Der Schwerpunkt der Aufgabenstellung für die vorliegende Dissertation lag

- in der vergleichenden Prüfung von meist in der jüngsten Literatur beschriebenen Methoden zum Nachweis von E.coli-Enterotoxinen,
- der Auswahl geeigneter Methoden für die praktische milchhygienische Diagnostik aufgrund von Untersuchungen an Handelsproben, und, davon abgeleitet,
- dem Vorschlag für einen sicheren und rationellen Untersuchungsgang.

Zunächst wurde versucht, biochemische Leistungskriterien zur Differenzierung von ETEC gegenüber apathogenen E.coli auszuwählen. Die Wahrscheinlichkeit, daß dieses in befriedigender Weise gelingen würde, wird durch das Faktum eingeschränkt, daß das Toxinbildungsvermögen von ETEC-Stämmen Plasmid codiert ist (101). Möglicherweise werden von diesem Plasmid aber gleichzeitig bestimmte Stoffwechseleigenschaften genetisch determiniert. Jedenfalls fanden De BOY II et al. (1980), daß die unterschiedliche Nutzung von Adonit und Dulcit zur Differenzierung gegenüber apathogenen Stämmen herangezogen werden kann. Dieses wird durch die eigenen Untersuchungen bestätigt. Als weiteres Kriterium bietet sich die gehäufte Äskulin-Spaltung durch ETEC-Stämme an. Diese drei Stoffwechselparameter können jedoch nur als Hinweise für ein Enterotoxinbildungsvermögen gewertet werden, z.B. bei der Vorselektion in der Untersuchung einer großen Anzahl von E.coli-Stämmen für den direkten Enterotoxin-Nachweis.

Hitzelabiles Toxin kann grundsätzlich über den Tierversuch, die Gewebekultur und neuartige serologische Methoden nachgewiesen werden. Der Tierversuch muß aus ethischen Gründen überall dort ausscheiden, wo er durch andere mindestens gleichwertige Methoden ersetzt werden kann. Dieses ist für den Nachweis von L-Toxin der Fall. Der ihm dem Wesen nach am nächsten stehende Gewebekultur-Test ist zwar nach DONTA et al. (1974) und GUERRANT et al. (1974) für den L-Toxinnachweis gut geeignet, erfordert jedoch nach BÄCK et al. (1979) einen erheblichen Aufwand. Zudem sind die Ergebnisse bisweilen nicht zweifelsfrei zu interpretieren.

Die Methode der Wahl ist nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens der Einsatz serologischer Verfahren mit ihrer hohen Spezifität, Empfindlichkeit und vergleichsweise eleganten Durchführbarkeit. Für die praktische Diagnostik ist - wie RAPPAPORT und BONDE (1981) gesichert haben - die sero-

logische Identität von Cholera- und E.coli L-Toxin von wesentlicher Bedeutung. Cholera-Toxin ist in hochgereinigter Form bereits kommerziell verfügbar. Mit seiner Hilfe können spezifische Antikörper zum Nachweis von E.coli L-Toxin gewonnen werden. Dieses wurde auch für die Durchführung der vorliegenden Arbeit genutzt. Als Nachweisprinzipien wurden der ELEK-Test, die Staphylokokken-Coagglutination und der GM₁-ELISA vergleichend geprüft.

Ein Vorteil des ELEK-Tests gegenüber anderen Geldiffusionstests ist, daß die Keime während der Inkubationszeit laufend Toxine in das feste Medium abgeben können, und am Ende der Hauptwachstumsphase durch Lysis der Zellen nach Polymyxineinwirkung eine maximale Toxinausbeute erreicht wird. Allerdings stehen für die Präzipitation von L-Toxin die erforderlichen hochgereinigten Antiseren allgemein nicht zur Verfügung. HONDA et al. (1981) versuchten, die Reinigung von Cholera-Antiserum mit Hilfe der Affinitätschromatographie zu erreichen. De MOL et al. (1981) schließen aus einem Vergleich mit dem GM₁-ELISA, daß der ELEK-Test mit ca. 3 Tagen etwa doppelt soviel Zeit beansprucht wie jener. Sie empfehlen deshalb den ELEK-Test für epidemiologische Felduntersuchungen. Für die Diagnostik im klinischen Laboratorium geben sie dem GM₁-ELISA den Vorzug. Dieses entspricht den eigenen Erfahrungen. In Verbindung mit den in Kap.4.1.2.1 beschriebenen Schwierigkeiten bei der technischen Durchführung wurde der ELEK-Test für die vorliegenden Untersuchungen nicht weiter verfolgt.

Der L-Toxinnachweis mit Hilfe der STAPHYLOKOKKEN-COAGGLUTINATION bietet die Vorzüge eines einfachen Objektträgertests und ermöglicht in kurzer Zeit die Beurteilung der Reaktion. Allerdings ist diese nicht unerheblich subjektiv beeinflusst und erschwert somit den Vergleich der Ergebnisse zwischen Untersuchern. Zudem treten bei der Prüfung von Feldstämmen nicht selten fragliche Reaktionen auf. Insgesamt ist die Staphylokokken-Coagglutination aber für Screeningzwecke gut geeignet.

Der ELISA ist durch hohe Empfindlichkeit und gute Wiederholbarkeit gekennzeichnet und ermöglicht eine sichere Quantifizierung des Ergebnisses. Die Modifikationen von SVENNERHOLM und HOLMGREN (1978), die erstmals das GM₁-Gangliosid als Antigenrezeptor zum Coaten von Polystyrol einsetzen, erübrigt im Testsystem die Verwendung eines zweiten Antikörpers (s. Abb.4), wie sie ursprünglich YOLKEN et al. (1979), der den ELISA zum Nachweis von E.coli L-Toxin eingeführt hat, empfohlen wurde. Die Nachweissensitivität des GM₁-ELISA für L-Toxin - gemessen als Choleratoxin-Äquivalent - liegt bei mindestens 1 ng/ml. Die gute Wiederholbarkeit findet

bei der 5-maligen Untersuchung von 2 Toxin-positiven Stämmen in den Variationskoeffizienten $V_K = 5,8\%$ bzw. $6,8\%$ ihren Ausdruck. Für das Coaten der Polystyrolkugeln werden 6 - 12 Stunden benötigt, Gekühlt können sie über Wochen präpariert vorrätig gehalten werden. Die weitere Durchführung des Tests bei vergleichsweise geringer Arbeitsbeanspruchung ist nach 1 1/2 Tagen abgeschlossen.

Für den Nachweis von hitze stabilen Toxinen ist der Tierversuch z.Z. noch nicht durch andere Methoden ersetzbar. Die Darmschlingen(Loop)-Technik erfordert einen größeren chirurgischen Eingriff. Dieser ist beim Baby-Maus-Test (BMT) entbehrlich, der mit der intragastralen Injektion einen geringen Eingriff erfordert. Bei seiner Durchführung ist zudem unter dem Aspekt des Tierschutzes zu berücksichtigen, daß die Leidensfähigkeit der nur bis zu 96 Stunden alten Babymäuse noch nicht voll ausgebildet sein dürfte. Nach SACK et al. (1975) stimmen die Ergebnisse des BMT gut mit denen der 6 Stunden-Darmschlingen-Technik beim Kaninchen überein.

Von den in der vorliegenden Arbeit geprüften 15 S-Toxin-bildenden Referenzstämmen konnte nur bei 12 Stämmen ein positiver Toxinnachweis geführt werden. Wahrscheinlich ist bei drei der über lange Zeit im Labor gehaltenen Stämme das für die S-Toxin-Produktion verantwortliche Plasmid verlorengegangen. Von zu untersuchenden Feldstämmen sollte daher möglichst schnell nach Bebrütung der Stämme in Caye-2-Bouillon ein bakterienfreier Überstand gewonnen und tiefgefroren werden. Das E.coli S-Toxin ist auf diese Weise über Monate zu konservieren. Die Empfindlichkeit des S-Toxinnachweises im BMT wird mit 2 ng angegeben (65). Als Ausdruck der Wiederholbarkeit wurde in der vorliegenden Untersuchung an 2 Referenzstämmen der Variationskoeffizient mit 7,4% bzw. 7,6% ermittelt. Im Vergleich zur Loop-Technik ist der BMT einschließlich der Ermittlung des Darm/ Restkörper-Quotienten an den mit Chloroform schmerzlos getöteten neugeborenen Mäusen schnell und sicher auszuführen.

Da das S-Toxin immunologisch ein Hapten ist, d.h. keine Antikörperbildung bewirkt, versuchte KAUFFMAN (1981) nach Kopplung des hitze stabilen Toxins an ein langkettiges Protein über Carbo-di-imid die Bildung von Antikörpern zu erreichen. Dieser Ansatz zum serologischen Nachweis auch von S-Toxin dürfte aussichtsreich sein und längerfristig den BMT ersetzen.

Von den vergleichend geprüften Methoden wurden der ELISA und die Staphykokken-Coagglutination für den Nachweis von L-Toxin sowie der BMT zu dem von S-Toxin anhand von Feldstämmen aus Handelsproben verschiedener Lebensmittel (überwiegend Milch und Milchprodukte) auf ihre Praktikabilität geprüft. Etwa die Hälfte der untersuchten E.coli-Stämme war aus Camembert isoliert worden, der für das Wachstum von E.coli gute Bedingungen bietet. Weichkäse vom Typ Camembert, Brie und Coulommiers wurde in den vergangenen Jahren wiederholt als Vektor für pathogene E.coli gefunden und in Lebensmittelvergiftungen inkriminiert. Die ausgewählten Untersuchungsmethoden ließen sich ohne Schwierigkeiten in der praktischen Diagnostik verwenden. Von 157 aus Lebensmitteln isolierten E.coli-Stämmen waren drei L-, einer S- und ein weiterer L-/S-Toxinbildner. Vier dieser Stämme wurden aus Camembert-Käse und ein Stamm aus Joghurt isoliert. SACK et al. (1977) konnten unter 240 aus Lebensmitteln tierischer Herkunft isolierten Stämmen 22 ETEC identifizieren. Dieser Untersuchung lagen überwiegend aus Fleisch verarbeitete Lebensmittel zugrunde. Dem entspricht, daß die von ihnen am häufigsten gefundenen O-Antigene der ETEC (O 149, O 147 und O 8) zu den am weitesten verbreiteten O-Antigenen der Coliflora des Schweines gehören. MEHLMAN et al. (1976) wiesen einen Enterotoxinbildner aus 40 von verschiedenen Lebensmitteln gewonnenen Isolaten nach. GLATZ und BRUDVIG (1980b) konnten in 78 Käseproben keine ETEC feststellen.

Aus den gewonnenen Erfahrungen über den Methodenvergleich und den Einsatz ausgewählter Tests in der praktischen Diagnostik ließ sich ein Untersuchungsgang entwickeln, der eine sichere und rationelle Identifizierung von E.coli-Enterotoxinen ermöglicht. Die wesentlichen Schritte sind: Anreicherung in E.E.-broth, Übertragung und Züchtung in CAYE-2-Bouillon, L-Toxinnachweis im GM₁-ELISA bzw. der Staphylokokken-Coagglutination und S-Toxinnachweis im BMT. Das Ergebnis aus der Staphylokokken-Coagglutination und dem BMT liegt nach 28 Stunden vor, für den GM₁-ELISA werden weitere 32 Stunden benötigt. Die herkömmliche Gewinnung von Einzelkolonien über Anreicherungs- und Selektivmedien beansprucht mehr Zeit und impliziert das Risiko, ETEC-Stämme zu übersehen, da sie phänotypisch von apathogenen E.coli nicht unterschieden werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte weiterhin die für die Klärung der Pathogenese durch E.coli ausgelösten Lebensmittelvergiftungen wichtige Frage bearbeitet werden, ob Enterotoxine bereits im Lebensmittel präformiert werden und damit unmittelbar zur Intoxikation führen können oder erst eine Manifestation der Erreger im Intestinum Voraussetzung für deren Toxinbildung im Wirtsorganismus ist. Mit dieser Frage haben sich bereits GLATZ und BRUDVIG (1980a) beschäftigt. Sie konnten feststellen, daß ein ETEC-Stamm in Milch (24 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert) nachweisbare Mengen von L-Toxin bildete. Dieses Ergebnis ließ sich in den eigenen Untersuchungen mit keinem der geprüften Referenzstämme reproduzieren. Jedoch war der Toxinnachweis aus einem Homogenat von Camembert-Käse bzw. Hackfleisch in phys. NaCl-Lösung möglich. Unter diesen Bedingungen wurde sowohl L- als auch S-Toxin gebildet. Das Nährmedium ist für die Toxinproduktion von wesentlichem Einfluß, die Keimzahl dagegen nur bedingt: In CAYE-2-Bouillon mit Lincomycinzusatz erreichen ETEC maximale Keimzahlen von 10^7 /ml, bilden aber relativ hohe Toxinmengen; im originären Camembert-Käse wachsen ETEC bis zu Größenordnungen von $10^8 - 10^9$ /g heran, bilden aber kein nachweisbares Toxin. In Camembert-Homogenat mit phys. NaCl-Lösung vermehren sich ETEC auf ein gleichhohes Keimzahlniveau, bilden jedoch geringere Toxinmengen - insbesondere an L-Toxin - als parallel in CAYE-2-Bouillon mit niedrigerer Keimzahl. GUSTAFSSON und MÖLLBY (1982) beobachteten, daß bei Verwendung von Brain Heart Infusion Broth (BHI) als Anzüchtungs- und Enterotoxinbildungs-Medium im Vergleich mit der CAYE-2-Bouillon im GM_1 -ELISA die gemessenen Toxintiter wesentlich niedriger ausfielen. Sie erklären dieses mit in der BHI vorhandenen Gangliosiden. Die GM_1 -Ganglioside stellen die Rezeptormoleküle für E.coli L-Toxin an der Oberfläche der Wirtszelle dar. Wenn freie Ganglioside schon während der Bebrütungszeit die Bindungsstellen des Toxins besetzen, wird die Nachweismöglichkeit durch Tests wie dem GM_1 -ELISA, dessen Grundlage die spezifische Bindung des Toxins an Ganglioside ist, eingeschränkt oder ganz verhindert. Das Vorhandensein freier Ganglioside im untersuchten Camembert-Käse könnte somit der Grund für den erfolglosen Nachweis von L-Toxin nach experimenteller Kontamination mit ETEC sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, daß auch eine S-Toxinbildung nicht nachgewiesen werden konnte.

Wenngleich das biochemische Wirkungsprinzip für die Hemmung der Toxinbildung im Lebensmittel noch nicht geklärt ist, läßt sich aus den eigenen Untersuchungen übereinstimmend mit GLATZ und BRUDVIG (1980a) schließen, daß E.coli-Enterotoxine in Lebensmitteln nicht oder nur unter extre-

men Bedingungen gebildet werden. Durch ETEC ausgelöste Darmerkrankungen sind offenbar in der Regel, wenn nicht sogar ausschließlich, Toxi-Infektionen, d.h., daß die Manifestierung der Erreger im Intestinum Voraussetzung für deren Toxinbildung im Organismus ist. Diese Haftung wird durch spezielle Adhäsionspili mit spezifischer Proteinstruktur bewirkt. E.coli-Stämme verfügen teilweise, wie viele Enterobacteriaceen, über allgemeine Mannose-empfindliche Pili (Typ I). Andere Stämme, die besonders bei Pyelonephritiden des Menschen vorkommen, können Mannose-resistente Pili (P-Pili) bilden. Von ETEC-Stämmen aus menschlichen Diarrhoe-Fällen wurden Plasmid-codierte serologisch differenzierbare hitzelabile Pili identifiziert, die eine Mannose-resistente Hämagglutination bewirken. Für die Bindung von ETEC-Pili an den Rezeptor liegen Hypothesen vor, die anzeigen, daß es sich um einen mehrere Schritte implizierenden Prozeß handelt (LINDBERG, 1982). Auch ist die Frage noch ungeklärt, ob Pili-Ausprägung und Enterotoxinbildung auf den selben oder verschiedenen Plasmiden codiert sind (108).

Nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens sind für die Entstehung der ETEC-Diarrhoe Erreger mit der Fähigkeit zur Bildung von sowohl spezifischen Pili als auch Enterotoxinen und Wirtsorganismen mit Pili-korrespondierenden Rezeptoren an den Darmepithelzellen essentiell.

Zur Bekämpfung der auch durch Lebensmittel als Vektoren übertragbaren ETEC, die weltweit offenbar erheblich an Diarrhoen beteiligt sind, ist neben hygienischen Maßnahmen die Entwicklung eines Impfstoffes unter Berücksichtigung dieser Kenntnisse und der Nutzung neuartiger gentechnologischer Möglichkeiten aussichtsreich.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Darmerkrankungen durch Enterotoxin-bildende E.coli (ETEC) gewinnen weltweit an Bedeutung. Lebensmittel sind häufig als Vektor impliziert.

Daraus leitet sich die Notwendigkeit ab, ETEC-Stämme und/oder die von ihnen gebildeten hitzelabilen (LT) sowie hitzestabilen (ST) Toxine sicher zu identifizieren.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hierzu durchgeführten Untersuchungen haben zu folgendem Ergebnis geführt:

Die biochemischen Stoffwechselfparameter Adonit, Dulcit und Äskulin liefern zwar Hinweise auf ein Enterotoxinbildungsvermögen, erlauben jedoch keine hinreichend sichere Differenzierung gegenüber apathogenen E.coli-Stämmen.

Auf den Tierversuch zum Nachweis von L-Toxin kann verzichtet werden. Auch der Gewebekulturtest ist in der praktischen Diagnostik serologischen Methoden unterlegen. Für die Identifizierung im ELEK-Test, der Staphylokokken-Coagglutination und dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist die serologische Identität von Cholera- und E.coli L-Toxin ein wesentlicher Vorteil, da mit hochgereinigtem Cholera-Toxin nicht nur Antikörper gegen dieses, sondern auch gegen E.coli L-Toxin gewonnen werden können. Das für die eigenen Untersuchungen hergestellte Serum hatte einen Titer von 1 : 200.000. Das Prinzip des ELEK-Tests wurde wegen mangelnder Empfindlichkeit nicht weiter verfolgt. Die einfach durchzuführende Staphylokokken-Coagglutination ist insbesondere für Screeningzwecke gut geeignet. Die Methode der Wahl ist der GM_1 -ELISA, mit dessen Hilfe weniger als 1 ng/ml Toxin bei guter Wiederholbarkeit nachgewiesen werden konnte.

Für den Nachweis von S-Toxin ist der Baby-Maus-Test (BMT) im Vergleich zur Loop-Technik gut geeignet.

ELISA und BMT haben sich auch im praktischen Einsatz zur Untersuchung von Lebensmittelproben gut bewährt.

Es ließ sich ein Untersuchungsgang entwickeln, der eine sichere und rationelle Identifizierung von E.coli-Enterotoxin ermöglicht. Dabei wird auf

die herkömmliche Isolierung von Einzelkolonien verzichtet. Die wesentlichen Schritte sind: Anreicherung in E.E.-broth, Übertragung und Züchtung in CAYE-2-Bouillon, L-Toxinnachweis im GM₁-ELISA bzw. der Staphylokokken-Coagglutination und S-Toxinnachweis im BMT.

Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß E.coli-Enterotoxine in den geprüften Lebensmitteln nicht oder nur unter extremen Bedingungen gebildet werden. Durch ETEC ausgelöste Darmerkrankungen sind somit offenbar Toxininfektionen, d.h. die Manifestierung der Erreger im Intestinum scheint Voraussetzung für deren Toxinbildung im Organismus zu sein.

SUMMARY

Enteric diseases caused by enterotoxigenic *E.coli* strains (ETEC) become more and more important all over the world. Frequently food is implicated as a vector.

From this the necessity arises to identify the ETEC strains and/or their heat-labile (LT) and heat-stable (ST) enterotoxins. The examinations carried out for the presented paper showed the following results.

The biochemical substrates adonitol, dulcitol and esculin slightly indicate the production of enterotoxins but they do not give a definitive differentiation of pathogenic and non pathogenic strains.

The detection of heat-labile enterotoxin can be done without animal experiments. Also tissue cultures are inferior to serological tests as a practicable diagnostic tool. For the identification of LT with aid of the ELEK-test, the co-agglutination and the ELISA, the serological identity of cholera-toxin and *E.coli* LT is an essential advantage: Highly purified cholera-toxin can be used also for the production of antibodies to *E.coli* LT. Our own serum got by this way yielded a titer of 1 : 200,000. The ELEK test was not further investigated because of its insufficient sensitivity. The co-agglutination may be helpful for screening purposes. The optimum, however, is the application of the GM₁-ELISA which enables the detection of 1 ng/ml of toxin with a good repeatability.

For the demonstration of heat-stable enterotoxin the suckling mouse assay (SMA) in comparison to the loop technique is very suitable.

ELISA and SMA have proved to be useful in practice for examination of food samples.

A total procedure was developed which enables a reliable and efficient identification of *E.coli* enterotoxin. As a result the conventional isolation of single colonies can be omitted. The essential steps are enrichment in E.E.-broth, the subcultivation in CAYE-2-broth, the identification of LT by the GM₁-ELISA resp. co-agglutination test and the detection of ST with aid of the SMA.

Other investigations could prove that *E.coli* enterotoxins are produced in food under extreme and unrealistic conditions only.

Enteric diseases caused by ETEC therefore seem to be toxic infections. The manifestation of the microorganisms in the intestinal tract may be a presupposition for the toxin production in vivo.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAM, A. (1923): Biology of colon bacillus in dyspepsia and its relation to pathogenesis and to intoxication. *Jahrb. Kinderheilk.* 101, 295-314
2. AVRAMEAS, S., T. TERNYNCK, J.-L. GUESDON (1978): Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol.* 8, 7-23
3. BÄCK, E., A.-M. SVENNERHOLM, J. HOLMGREN, R. MÖLLBY (1979): Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 10, 791-795
4. BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (1974), Eighth Edition, Williams & Wilkins Company, Baltimore
5. BERGMAN, M. J., W. S. UPDIKE, S. J. WOOD, S. E. BROWN III, R. L. GUERRANT (1981): Attachment factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* from patients with acute diarrhea from diverse geographic areas. *Infect. Immun.* 32, 881-888
6. BLACK, R. E., M. H. MERSON, I. HUQ, A. R. M. A. ALIM, M. YUNUS (1981): Incidence and severity of rotavirus and *Escherichia coli* diarrhoea in rural Bangladesh. Implications for vaccine development. *Lancet* I, 141-143
7. BOCKEMÜHL, J. (1975): Zur Pathogenese der toxinbedingten Gastroenteritis durch Vibrionen und Coli-Bakterien. *Dtsch. Med. Wschr.* 100, 487-490
8. BOCKEMÜHL, J. (1980): Eigenschaften und Wirkung von Enterotoxinen gramnegativer Bakterien. *Immunität u. Infektion* 8, 43-49
9. BOCKEMÜHL, J., G. FRICKE, H. P. R. SEELINGER (1979): Enteritisfälle durch *Escherichia coli* O142 K86 H34 in einer Frühgeborenenstation. Mit einem Diskussionsbeitrag zur Frage der pathogenetischen Bedeutung "enteropathogener Coli-Typen". *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 243, 197-206
10. BRAY, J. (1945): Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhea of infants. *J. Path. Bact.* 57, 239-247
11. BRILL, B. M., B. L. WASILAUSKAS, S. H. RICHARDSON (1979): Adaption of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 9, 49-55
12. de CASTRO, A. F. P., M. B. SERAFIM, A. J. GOMES, M. S. V. GATTI (1980): Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 12, 714-717
13. COSTIN, I. D. (1966): Diarrheal diseases in children and adults associated with *Escherichia coli* strains not belonging to enteropathogenic serotypes. *Path. Microbiol.* 29, 214-227
14. COSTIN, I. D., D. VOICULESCU, V. GORCEA (1964): An outbreak of food poisoning in adults associated with *Escherichia coli* serotype O86:B7:H34. *Path. Microbiol.* 27, 68-78

15. DALLAS, W.S., S.FALKOW (1979): The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of *Escherichia coli*. *Nature* 227, 406-407
16. DE, S.N., D.N.CHATTERJE (1953): An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Path. Bact.* 66, 559-562
17. DEAN, A.G., Y.-C.CHING, R.G.WILLIAMS, L.B.HARDEN (1972): Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125, 407-411
18. De BOY II, J.M., J.K.WACHSMUTH, B.R.DAVIS (1980): Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect. Immun.* 29, 361-368
19. DELEPINE, S. (1903): Food poisoning and epidemic diarrhea. *J. Am. Med. Ass.* 40, 657
20. DENECKE, C.F., G.M.THORNE, S.L.Gorbach (1981): Serotypes of attachment pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.* 32, 1254-1260
21. DONTA, S.T., H.W.MOON, S.C.WHIPPLE (1974): Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* 183, 334-336
22. DORNER, F., H.JAKSCHE, W.STOCKL (1976): *Escherichia coli* enterotoxin: Purification, partial characterization, and immunological observations. *J. Infect. Dis.* 133, 142-156
23. DUPONT, H.L., S.B.FORMAL, R.B.HORNICK, M.J.SNYDER, J.P.LIBONATI, D.C.SHEAHAM, E.H.LaBREC, J.P.KALAS (1971): Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 285, 1-9
24. ELEK, S. (1948): The recognition of toxinogenic bacterial strains in vitro. *Br. Med. J.* 1, 493-496
25. ENGVALL, E., P.PERLMAN (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulins in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129-135
26. EVANS, D.G. (1973): Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 7, 873-880
27. EVANS, D.G., D.J.EVANS Jr., H.L.DUPONT (1977a): Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 136, 118-123
28. EVANS, D.J. Jr., D.G.EVANS (1973): Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8, 322-328
29. EVANS, D.J. Jr., D.G.EVANS (1977b): Inhibition of immune hemolysis: Serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 5, 100-105
30. EVANS, D.J. Jr., D.G.EVANS, H.L.DUPONT, F.ØRSKOV, I.ØRSKOV (1977c): Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: Suggestive evidence for an interrelationship with serotype. *Infect. Immun.* 17, 105-111

31. EVANS, D.J. Jr., D.G. EVANS, S.L. GORBACH (1973): Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8, 725-730
32. FINKELSTEIN, R.A. (1976): The cholera-enterotoxin - Robert Koch revisited. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 235, 13-19
33. FORMAL, S.B., A.O'BRIEN, P. GEMSKI, P.B. DOCTOR (1978): Invasive *Escherichia coli*. *J. Am. Med. Ass.* 173, 596-598
34. GANGAROSA, E.J., M.H. MERSON (1977): Epidemiological assessment of the relevance of the so-called enteropathogenic serogroups of *Escherichia coli* in diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 296, 1210-1213
35. GIANELLA, R.A. (1976): Suckling mouse assay model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: Characteristics of the model. *Infect. Immun.* 14, 95-99
36. GIANELLA, R.A., K.W. DRAKE (1979): Effect of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. *Infect. Immun.* 24, 19-23
37. GILL, D.M. (1979): LT-Catalyzed ADP-ribosylation and its relation to LT structure. Abstracts, 15th Joint Conference on Cholera the US-Japan cooperative Medical Science Program, Bethesda (Maryland)
38. GILL, D.M., S.H. RICHARDSON (1980): Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *E. coli*: Comparison with cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 141, 64-70
39. GLATZ, B.A., S.A. BRUDVIG (1980, a): Enterotoxin production in milk by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protection* 43, 298-299
40. GLATZ, B.A., S.A. BRUDVIG (1980, b): Survey of commercially available cheese for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Protection* 43, 395-398
41. GOLDSCHMIDT, M.C., H.L. DUPONT (1976): Enteropathogenic *Escherichia coli*: Lack of correlation of serotype with pathogenicity. *J. Infect. Dis.* 133, 153-156
42. GORBACH, S.L. (1970): Acute diarrhea - a "toxin" disease? *N. Engl. J. Med.* 283, 44-45
43. GORBACH, S.L., B.H. KEAN, D.G. EVANS, D.J. EVANS Jr., D. BESSUDO (1975): Travelers' diarrhea and toxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 292, 933-936
44. GROSS, R.J., S.M. SCOTLAND, B. ROWE (1976): Enterotoxin testing of *Escherichia coli* causing epidemic infantile enteritis in the U.K. *Lancet I*, 629-631
45. GUERRANT, R.L., L.L. BRUNTON, T.C. SCHNAITMAN, L.J. REBHUN, A.G. GILMAN (1974): Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 10, 320-327

46. GUINEE, P.A.M., W.H.JANSEN (1979): Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human porcine and bovine origin; a comparative study. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A* 243, 245-257
47. GURWITH, M. (1977): Rapid screening method for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 6, 314-316
48. GUSTAFSSON, G., R.MÖLLBY (1982): GM₁ ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by human and porcine *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 15, 298-301
49. HALLMANN, L., F.BURKHARDT (1974): *Klinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4. Aufl., 97-103
50. HARTREE, E.F. (1972): Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48, 422-427
51. HARRIS, J.R., J.K.WACHSMUTH, B.R.DAVIS, M.L.COHEN (1982): High-molecular-weight plasmid correlates with *Escherichia coli* enteroinvasiveness. *Infect. Immun.* 37, 1295-1298
52. HOBBS, B.C., B.ROWE, M.KENDALL, P.C.B.TURNBULL, A.C.GHOSH (1976): *Escherichia coli* O27 in adult diarrhoea. *J. Hyg. Camb.* 77, 393-400
53. HOBBS, B.C., M.E.M.THOMAS, J.TAYLOR (1949): School outbreak of gastro-enteritis associated with a pathogenic paracolon bacillus. *Lancet* II, 530-532
54. HOLMGREN, J., A.-M.SVENNERHOLM (1978): ELISA for the study of enterotoxic diarrheal diseases. *Scand. J. Immunol.* 8, 111-118
55. HOLMGREN, J., A.-M.SVENNERHOLM (1979): Immunological cross-reactivity between *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin A and B subunits. *Curr. Microbiol.* 2, 55-58
56. HOLMGREN, J., A.-M.SVENNERHOLM, J.LÖNNROTH, M.FALL-PERSSON, B.MARKMAN, H.LUNDBECK (1977): Development of improved cholera vaccine on subunit toxoid. *Nature* 269, 602-604
57. HONDA, T., S.CHEARSKUL, Y.TAKEDA, T.MIWATANI (1980): Immunological methods for detection of kanagawa phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 11, 600-603
58. HONDA, T., S.TAGA, Y.TAKEDA, T.MIWATANI (1981): Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 13, 1-5
59. HUGHES, J.M., F.MURAD, B.CHANG, R.L.GUERRANT (1978): Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature* 271, 755-756
60. KAUFFMAN, P.E. (1981): Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 611-614

61. KIRCHNER, A. (1981): Enteropathogene *Escherichia coli*, ihre Pathogenitätsfaktoren und deren Nachweisverfahren (Übersichtsreferat). Tierärztl. Umschau 36, 747-758
62. KIRKEGAARD, M.K., C.R.FIELD (1977): Rapid slide coagglutination test for identifying and typing group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 6, 266-270
63. KITZROW, D., J.BRÜCKLER, H.BLOBEL (1979): Serologischer Nachweis der "Contagious Equine Metritis" (CEM)-Bakterien unter Verwendung protein A-positiver Staphylokokken. Tierärztl. Umschau 34, 32-36
64. KLIPSTEIN, F.A., B. ROWE, R.F.ENGERT, H.B.SHORT, R.J.GROSS (1978): Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of *Escherichia coli* isolated from infants with epidemic diarrhea. Infect. Immun. 21, 171-178
65. KLIPSTEIN, F.A., R.F.ENGERT, J.D.CLEMENTS (1981): Protection in rats immunized with *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 34, 637-639
66. KRONVALL, G. (1973): A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody absorbed to protein A-containing staphylococci. J. Med. Microbiol. 6, 187-190
67. LaBREC, E.H., H.SCHNEIDER, T.MAGNANI (1964): Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery. J. Bact. 88, 1503-1518
68. LALLIER, R., S.LARIVIERE, S.St-PIERRE (1980): *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: Rapid method of purification and some characteristics of the toxin. Infect. Immun. 28, 469-474
69. LEVINE, M.M., E.J.BERGQUIST, D.R.NALIN, D.H.WATERMAN, R.B.HORNICK, C.R.YOUNG, S.SCOTMAN (1978): *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. Lancet I, 1119-1122
70. LEVNER, M., F.P.WIESNER, B.A.RUBIN (1977): Induction of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. Infect. Immun. 15, 132-137
71. LINDBERG, A.A. (1982): Specificity of fimbriae and fimbrial receptors. Microbiology 1982, David Schlessinger, 317-323
72. MANCINI, G., A.O.CARBONARA, J.F.HEREMANS (1965): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2, 235-254
73. MARIER, R., J.G.WELLS, R.C.SWANSON, W.CALLAHAN, I.J.MEHLMAN (1973): An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported french cheese. Lancet II, 1376-1378
74. MEHLMAN, I.J., M.FISHBEIN, S.L.GORBACH, A.C.SANDERS, E.L.EIDE, J.C.OLSON Jr. (1976): Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food. J. of the AOAC 59, 67-80

75. MERSON, M.H., F.ØRSKOV, I.ØRSKOV, R.B.SACK, I.HUQ, F.T.KOSTER (1979): Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 23, 325-329
76. MERSON, M.H., R.H.YOLKEN, R.B.SACK, J.L.FROEHLICH, H.B.GREENBERG, I.HUQ, R.W.BLACK (1980): Detection of *Escherichia coli* enterotoxins in stools. *Infect. Immun.* 29, 108-113
77. DeMOL, P., W.HEMDHOF, E.PAPA-KANGO, J.P.BUTZLER, N.BRAVO, T.HONDA (1982): Detection of *Escherichia coli* producing heat-labile toxin: Comparison between Y₁-adrenal cell assay, ganglioside ELISA, and Biken tests. *Lancet I*, 739-740
78. MOON, H.W., P.Y.FUNG, S.C.WHIPPS, R.E.ISAACSON (1978): Effects of age and ambient temperature on the response of infant mice to heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: Assay modifications. *Infect. Immun.* 20, 36-39
79. MOON, H.W., E.M.KOHLER, R.A.SCHNEIDER, S.C.WHIPPS (1980): Prevalence of pilus antigens, enterotoxin types and enteropathogenicity among K88-negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.* 27, 222-230
80. MÜLLER, H.E. (1976): Das Cholera-Syndrom - Pathogenese und Erreger. *Münch. med. Wschr.* 118, 27-30
81. MUNDELL, D.H., C.R.ANSELMO, R.M.WISHNOW (1976): Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.* 14, 383-388
82. O'BRIEN, A.D., M.R.THOMPSON, J.R.CANTEY, S.B.FORMAL (1977): Production of *Shigella dysenteriae* - like toxin by pathogenic *Escherichia coli*. *Abstr. Ann. Meeting ASM*, No.B 103, New Orleans
83. OLSSON, E., O.SÖDERLIND (1980): Comparison of different assays of definition of heat-stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains. *J. Clin. Microbiol.* 11, 6-15
84. ØRSKOV, F., I.ØRSKOV (1978): Special *Escherichia coli* serotypes from enteropathies in domestic animals and man. *Verlag Paul Parey, Fortschritte d. Veterinärmed.* 29, 7-14
85. ØRSKOV, I., F.ØRSKOV, A.BIRCH-ANDERSEN (1980): Comparison of *Escherichia coli* fimbrial antigen F7 with type 1 fimbrial. *Infect. Immun.* 27, 657-666
86. RAPPAPORT, R.S., G.BONDE (1981): Development of a vaccine against experimental Cholera and *Escherichia coli* diarrheal disease. *Infect. Immun.* 32, 534-541
87. ROLLE, M., A.MAYR (1978): *Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 4. Aufl., 679-684
88. RYDER, R.W., D.A.SACK, A.Z.KAPIKIAN, A.S.M.RAHMAN, M.H.MERSON, J.G.WELLS (1976): Enterotoxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in rural Bangladesh. *Lancet I*, 659-663

89. SACK, D.A., M.H. MERSON, J.G. WELLS, R.B. SACK, G.K. MORRIS (1975): Diarrhea associated with heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Lancet* II, 239-241
90. SACK, D.A., R.B. SACK (1975): Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y1 adrenal cell in miniculture. *Infect. Immun.* 11, 334-336
91. SACK, R.B. (1975): Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 29, 333-353
92. SACK, R.B. (1976): Serotyping of *E. coli*. *Lancet* I, 1132
93. SACK, R.B., S.L. GORBACH, J.G. BANWELL, B. JACOBS, B.D. CHATTERJEE, R.C. MITRA (1971): Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J. Infect. Dis.* 123, 378-385
94. SACK, R.B., N. HIRSCHHORN, J. BROWNLEE, R.A. CASH, W.E. WOODWARD, D.A. SACK (1975): Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in Apache children. *N. Engl. J. Med.* 292, 1044-1045
95. SACK, R.B., D.A. SACK, I.J. MEHLMAN, F. ØRSKOV, I. ØRSKOV (1977): Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *J. Infect. Dis.* 135, 313-317
96. SAKAI, S., T. ITOH, T. MARUYAMA, K. SAITOH, H. ZEN-YOJI (1975): Outbreaks of acute enterocolitis ascribed to the infection of *Escherichia coli* O6:K?(L): H-. *Ann. Rep. Tokyo Metropolitan Res. Lab. Public Health* 22, 1-6
97. SATTERWHITE, T.K., D.G. EVANS, H.L. DUPONT, D.J. EVANS Jr. (1978): Role of *Escherichia coli* colonisation factor antigen in acute diarrhoea. *Lancet* II, 181-184
98. SERAFIM, M.B., A.F.P. DeCastro, M.H. LEMOS DOS REIS, L.R. TRABULSI (1979): Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. *Infect. Immun.* 24, 606-610
99. SERENY, B. (1955): Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: A preliminary report. *Acta Microbiol. Acad. Sci Hung* 2, 293-296
100. SKERMAN, F.J., S.B. FORMAL, S. FALKOW (1972): Plasmid associated enterotoxin production in a strain of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.* 5, 622-624
101. SMITH, H.W., M.B. HUGGINS (1977): The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. *J. Med. Microbiol.* 11, 471-492
102. SMITH, H.W., M.A. LINGGOOD (1971): Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 4, 467-485

103. SÖDERLIND, O., R. MÖLLBY (1979): Enterotoxins, O-groups, and K88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal piglets with and without diarrhea. *Infect. Immun.* 24, 611-616
104. STAPLES, S. J., S. E. ASHER, R. A. GIANELLA (1980): Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of *E. coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.* 255, 4716-4721
105. SVENNERHOLM, A.-M., J. HOLMGREN (1978): Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.* 1, 19-23
106. TAYLOR, W. R., W. L. SCHELL, J. G. WELLS, K. CHOI, D. E. KINNUNEN, P. T. HEISER, A. G., HELSTAD (1982): A foodborne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 306, 1093-1095
107. THOMAS, D. D., F. C. KNOOP (1982): The effect of calcium and prostaglandin inhibitors on the intestinal fluid response to heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Diss.* 145, 141-147
108. THOMAS, L. V., A. CRAVIOTO, S. M. SCOTLAND, B. ROWE (1982): New fimbrial antigenic type (E 8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. *Infect. Immun.* 35, 1119-1124
109. TOLLE, A., I. OTTE, G. SUHREN, W. HEESCHEN (1980): Zur Mikroflora von Camembert. *Milchwissenschaft* 35, 21-25
110. TOLLE, A., I. OTTE (1981): Zur mikrobiellen Assoziation in Camembert. DVG-Tagungsbericht der 21. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 256-267
111. TOLLE, A., I. OTTE, G. SUHREN (1981): Zur Dynamik der produktspezifischen Keimflora und von coliformen Keimen/*E. coli* während des Herstellungsprozesses von Camembert. *Milchwissenschaft* 36, 5-9
112. TULLOCH, F., K. J. RYAN, S. B. FORMAL, F. A. FRANKLIN (1973): Invasive enteropathic *Escherichia coli* dysentery. An outbreak in 28 adults. *Ann. intern. Med.* 79, 13-17
113. Van der WAALJ, D., T. M. SPELTIE, P. A. M. GUINEE, C. AGTERBERG (1975): Serotyping and biotyping of 160 *Escherichia coli* strains: Comparative study. *J. Clin. Microbiol.* 1, 237-238
114. WACHSMUTH, I. K., S. FALKOW, R. W. RYDER (1976): Plasmid-mediated properties of a heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 14, 403-407
115. YOLKEN, R. H., H. B. GREENBERG, M. H. MERSON, R. B. SACK, A. Z. KAPIKIAN (1977): Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 6, 439-444

8. ANHANG

1. Anreicherungsmedien

A. Nährbouillon

Zusammensetzung:	Fleischextrakt	3 g
	Pepton aus Fleisch	5 g
	Aqua dest. ad	1000 ml

B. Enterobacteriaceae-Anreicherungsmedium (E.E-broth)

Zusammensetzung:	Pepton	10 g
	Dextrose	5 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	6,45 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
	Rindergalle, gereinigt	20 g
	Brillantgrün	0,0135 g
	Aqua dest. ad	1000 ml

2. Selektivmedien

A. Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar (VRB = Violett-Red-Bile)

Zusammensetzung:	Hefeextrakt	3 g
	Pepton	7 g
	Gallesalze	1,5 g
	Laktose	10 g
	Natriumchlorid	5 g
	Neutralrot	0,03 g
	Kristallviolett	0,002 g
	Agar (je nach Geliereigen- schaften des Agars)	10-15 g
	Aqua dest. ad	1000 ml

B. Eosin-Methylenblau-Laktose-Agar (EMB)

Zusammensetzung:	Pepton	10 g
	Laktose	10 g
	Dikaliumhydrogenphosphat	2 g
	Eosin	0,4 g
	Methylenblau	0,065 g
	Agar	15 g

3. Standardmedium für die Toxinproduktion:

(CAYE-2-Bouillon

CAYE-Casamino Acid-Yeast-Extract-Salts-Medium)

Zusammensetzung:	Casamino Acids (Difco)	2 %
	Hefe-Extrakt (Difco)	0,5 %
	Dikaliumhydrogenphosphat	0,871 %
	Natriumchlorid	0,25 %
	Salzlösung	0,1 %
	bestehend aus:	5 % $MgSO_4$
		0,5% $Mn Cl_2$
		0,5% $FeCl_3$

auf pH 8,5 mit 1 N NaOH und
1 N HCl einstellen.

Nach dem Autoklavieren (20 Min./120°C)

steriles Zugabe von 0,25% Glukose

und 20 µg/ml Lincomycin.

Für den ELEK-Test wurde ein festes Medium (Zugabe von 1,5% Noble Agar, Difco) gleicher Zusammensetzung (pH 7,5) benutzt.

4. Anzuchtungsmedium für die experimentelle Inokulation von Milch und Milchprodukten

Caseinpepton Sojamehl-Bouillon (TSB = Trypticase Soy Broth)

Zusammensetzung:	Trypticase Pepton	17,0 g
	Phytone Pepton	3,0 g
	Natriumchlorid	5,0 g
	Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g
	Aqua dest. ad	1000 ml

Trypticase Soy Broth (TSB) diente außerdem als Anreicherungsmedium des Cowan-I-Stammes für die Staphylokokken-Coagglutination.

5. Medium für die Radialdiffusion nach MANCINI

Zusammensetzung:	Agarose	1 %
	Natrium-Barbiturat	0,02 M
	Barbitursäure	0,02 M
	Natriumazid	0,1 %
	pH 8,6	

Herrn Professor Dr. Alf Tolle danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit unter besten Bedingungen.

Herrn Dr. Günther Hahn gilt mein besonderer Dank für seine jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Am 20. Juli 1952 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Dieter Franke und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Rath, in Grossensee geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Heikendorf von 1959 - 1964 wechselte ich auf das Staatliche Gymnasium Kiel-Wellingdorf, wo ich im Juni 1972 das Abitur ablegte.

Ab Herbst 1972 leistete ich zwei Jahre Wehrdienst bei der Bundeswehr. Ab Wintersemester 1974/75 studierte ich an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel Trophologie.

Das Studium der Tiermedizin begann ich zum Wintersemester 1975/76 an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier bestand ich am 15. Januar 1981 das tierärztliche Staatsexamen.

Ab März 1981 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel tätig und erhielt hier die Möglichkeit zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation.

an die 1890er Jahre ist die Zeit der Entstehung der ersten
und ersten großen Dichtung, die sich in der Dichtung findet.

Die Zeit der Dichtung ist die Zeit der Dichtung, die die Dichtung
an sich selbst und die Dichtung an sich selbst ist.

An dieser Zeit wurde die Dichtung in der Dichtung
an sich selbst und die Dichtung an sich selbst ist.

Die Dichtung an sich selbst ist die Dichtung an sich selbst
an sich selbst und die Dichtung an sich selbst ist.

Die Dichtung an sich selbst ist die Dichtung an sich selbst
an sich selbst und die Dichtung an sich selbst ist.

